

Chemische
Studien über die Verbindungen des Blutfarbstoffes
mit den
Schwermetallen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

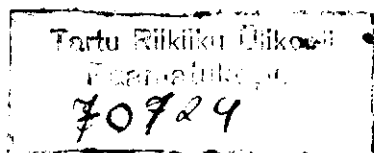
Magisters der Pharmacie

verfasst und mit Bewilligung

Einer Hochverordneten Medicinischen Facultät der Kaiserl.
Universität zu Jurjew — Dorpat

zur öffentlichen Vertheidigung bestimmt

von



Jaak Jutt,

aus dem Pernauschen.

Ordentliche Opponenten:

Priv. Doc. Mag. N. Kromer. — Prof. Dr. D. Barfurth. — Prof. Dr. R. Kobert.

Jurjew.

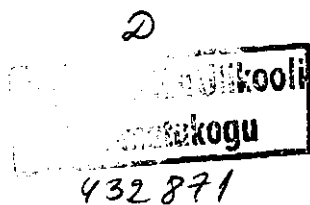
Druck von K. A. Hermann's Buchdruckerel.
1894.

ПЕЧАТАНО СЪ РАЗРЕШЕНИЯ МЕДИЦИНСКАГО ФАКУЛЬТЕТА ИМПЕРАТОРСКАГО
ЮРЬЕВСКАГО УНИВЕРСИТЕТА.

ЮРЬЕВЪ, 2 ДЕКАБРЯ 1894 г.

№ 801.

Деканъ: С. Васильевъ.



Arbeitsamen und Forschbegierigen

in hoher Verehrung

gewidmet.

Indem ich die vorliegende Arbeit der Oeffentlichkeit übergebe, sage ich meinen hochverehrten Lehrern, den Herren Professoren DDr. E. Russow, G. Tammann, J. Lemberg, J. v. Kennel, G. Dragendorff, sowie dem Herrn Professor Fürsten Galizin, welchen ich meine wissenschaftliche Ausbildung verdanke und welche während meiner Studienzeit in mir die Liebe zu den Naturwissenschaften wachgerufen haben, meinen aufrichtigsten Dank.

Ganz besonders bitte ich aber den Herrn Professor Dr. R. Kobert für die Ueberlassung des obigen Themas und für die nieversagende Liebenswürdigkeit und Interesse, mit welcher er stets mich bei meiner Arbeit geleitet hat, meinen tiefstempfundenen Dank entgegen nehmen zu wollen.

Gleichfalls danke ich dem Herrn Dozenten Dr. Fr. Krüger für die Liebenswürdigkeit, mit welcher er mir die Räumlichkeiten des physiologischen Instituts zur Verfügung gestellt und für die Rathschläge, die er mir bei Oxyhaemoglobin Darstellung ertheilt hat.

I.

Einleitung.

Da Alles ¹⁾, was wir als Lebensäußerungen unseres Leibes zu betrachten gewohnt sind, da Ernährung und Wachsthum, Bewegung und Empfindung, da unser Handeln und Thun, unsere Lust und unser Schmerz, da Alles dieses nur möglich ist auf Grundlage der ununterbrochenen Stoff- und Kraftmetamorphosen, welche der eingeathmete Sauerstoff in unserem Körper herbeiführt. Da Alles dieses und auch unser Trachten, Denken und Wollen auf der Grundlage der nie ruhenden Verbrennung unserer Leibesbestandtheile beruht, oder wenigstens in strenger Abhängigkeit von der rastlos in uns zehrenden Arbeit des Sauerstoffs steht, — so ist es wohl der Mühe werth, dass man den interessanten Stoff, den Farbstoff der rothen Blutkörperchen, — Haemoglobin — welcher in unserem Körper die Vermittelung und Uebertragung des Sauerstoffs an die einzelnen Zellen besorgt, trotz aller Schwierigkeiten und auf Gefahr hin, keine Lorbeeren dafür zu ernten, näher studiert, um eventuell aus seinen Verbindungen und Zersetzungsproducten, seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften Rückschlüsse auf ihn selbst, sowie auch auf andere physiologische und pathologische Vorgänge in unserem Körper machen zu können.

Schon seit mehreren Jahren arbeitet Prof. Kobert mit seinen Schülern an Haemoglobin und Haemoglobinderivaten.

Es ist ungemein schwierig mit solchen leichtzersetzlichen Körpern, wie Haemoglobin, zu arbeiten, beim besten Willen und grösstem Ausdauer kommt man nur sehr langsam vorwärts.

Dennoch ging ich mit Freuden darauf ein, als Herr Prof. Kobert mir, auf mein Ersuchen um ein Thema, gütigst das Studium der Verbindungen des Haemoglobins mit den Schwermetallen vorschlug.

Wohl wissend, mit welchen Schwierigkeiten ich dabei zu kämpfen habe, übernahm ich das Thema nicht deshalb, weil ich mich zur Lösung dieser Fragen gewachsen fühlte, sondern nur mit dieser stillen Hoffnung ging ich an die Arbeit, dass ich mit gutem Willen vielleicht doch ein Sandkörnchen zur Lösung einiger dieser Fragen beitragen könnte.

In wiefern meine Hoffnung sich erfüllt hat, wird der Leser aus den nachfolgenden Zeilen ansehen.

Was meine Arbeit noch besonders erschwerte, war der Umstand, dass ich zur Darstellung und Aufbewahrung meiner Praeparate beständig, monatelang, mir künstliche Kälte erzeugen musste, weil ich in den heissesten Sommermonaten arbeitete.

Obwohl schon Zetzl^{*)} 1769 die Fällbarkeit des Blutserums durch Metallsalzlösungen kannte und nach ihm eine ganze Anzahl berühmter Autoren²⁾ wie: Thenard, Thomson, Hühnefeld, Berzelius, Rose, Denis, Lassaigne, Mitscherlich, Mulder, Liebig, Simon, Wurtz, Scherer, Lehmann, Panum, Lieberkühn, Bielitzky, Robin und Verdeil, Schmidt, Wittich, Schwarzenbach, Millou und Commaille, Brücke, Djakonow, Gautier, Ritthausen und Pott, Stutzer und Fassbender, Birot, Bechamp und Baltus, Meissel, Mörner, Schützenberger, Hofmeister, Kowalewsky, Harnack, Chittenden und Whitehouse, Halliburton, Palm, Auriol und Monnier, Werigo etc. sich abmühten die Eiweissstoffe und die Metallverbindungen der Eiweissstoffe rein darzustellen, um aus den Analysen dieser Verbindungen dann eventuell Einsicht in die Molekularverhältnisse der Eiweisskörper zu gewinnen, dennoch habe ich in der ganzen Litteratur, soweit sie mir zugänglich gewesen ist, auch nicht die leiseste Andeutung^{*)} darüber gefunden,

^{*)} Vielmehr glebt Hoppe Seyler in seinem Handbuche der physiologisch-chemischen Analyse an, dass ihm ausser Alkohol und Kaliumcarbonat keine Körper bekannt sind, welche das O²Hb ohne Zersetzung fällen.

dass Jemand auf den Gedanken gekommen wäre resp. versucht hätte das Haemoglobin mittelst Metalle zu fällen.*) Es ist desto merkwürdiger, da ja die Herren sich unnütz abmühten einen wirklich reinen Eiweissstoff darzustellen, die Darstellung des krystallisirten, reinen Haemoglobins, welches ja ebenfalls ein Eiweissstoff ist, aber bekannt war und das Haemoglobin ja auch sonst unserer grössten Interesse werth ist.

Es ist das Verdienst Prof. Koberts, in einer Reihe von Vorträgen³⁾ zuerst darauf aufmerksam gemacht zu haben, dass auch Blutfarbstoff mit Metallen Verbindungen eingeht und durch diese gefällt werden kann.

Auf Prof. Koberts Anregung haben dann seine Schüler Grahe⁴⁾ und Klemptner⁵⁾ die Zink- und Kupfer-Verbindungen des Haemoglobins näher studirt, worauf zu sprechen ich noch im Verlaufe meiner Arbeit zurückkommen werde.

II.

Voruntersuchungen.

Bevor ich zur Darstellung von chemisch-reinen Metallverbindungen schritt, wollte ich zuerst die Wirkung der verschiedenen Metallsalze auf die einzelnen, isolirten Hauptbestandtheile — Stroma, Serum und O^2Hb des Blutes feststellen. — Zugleich versuchte ich auch der von Prof. Kobert aufgeworfenen Frage näher zu kommen, ob es möglich ist, den Hb-gehalt des Blutes titrimetrisch zu ermitteln.

I. Stromatafällungen.

Zu diesen Versuchen wurde mir von Prof. Kobert freundlichst das Blut von zwei Hähnen zur Verfügung gestellt, woraus

*) Struve in Tiflis soll, wie mir nachträglich mitgetheilt wurde, irgendwo angegeben haben, dass man das Blut mittelst Zn fällen könne. Doch scheint irgend eine practische Verwerthung dieser Beobachtung nicht angegeben worden zu sein und auch nicht gesagt, ob das O^2Hb dabei unzersetzt bleibt.

ich die Stromata nach von Semmer⁶⁾ und Prof. A. Schmidt⁷⁾ angegebener Methode isolirte, indem ich die rothen Blutkörperchen mit dem 10-fachen Volumen destillirten Wassers versetzte und an einem kühlen Orte in hohen Glascylindern so lange stehen liess, bis sich am Boden des Gefässes ein deutlicher abgegrenzter, gelblichweisser Bodensatz von Stromata der rothen Blutkörperchen gebildet hatte. Darauf heberte ich die über dem Bodensatz befindliche, das Hb und die übrigen Blutbestandtheile enthaltende Flüssigkeit ab, löste die Stromata in 10 pCt.-ger Kochsalzlösung auf und goss die Stromatalösung vorsichtig, damit keine Luftblasen und Schaum entstanden, welche das Zubodensinken der Stromata verhindern würden, in ein hohes Glascylindergefäss mit vielem luftfreiem destillirten Wassers.

Diese Procedur wurde solange wiederholt, bis die Stromata-eiweissstoffe nach wiederholtem Auflösen und Herausfällen vollständig schneeweiss erschienen. Auf diese Art isolirten, reinweissen Stromata wurden in 10 pCt.-ger Lösung chemischreinen Chlornatriums aufgelöst und filtrirt. Die Lösung war klar, schwach gelblich und es konnte in ihr spectroscopisch, selbst in sehr dicker Schicht kein O²Haemoglobin oder seine Zersetzungsproducte nachgewiesen werden.

Da diese Stromatalösung in Kochsalz sich nicht mehr viel verdünnen liess, ohne dass eine Trübung durch Herausfallen der Stromataeiweissstoffe dabei entstand, so musste ich meine Versuche mit der concentrirten Lösung anstellen. — Dabei stellte sich heraus, dass weder concentrirte noch verdünnte Lösungen von: Cr, — Fe, — Ni, — Co, — Zn, — Cd, — Cu, — Ag, — Hg, — Sn, — Pb, — Mn, — Bi, — Pt, — Ur, — Mo, — Wo, — und Thalliumsalzlösungen vollständig gefällt wurden, meist trat nur eine schwache Trübung ein.

Hieraus musste ich schliessen, dass die Stromataeiweissstoffe mit den Metallen Verbindungen eingehen, welche in chemisch-reiner 10 pCt.-ger Chlornatriumlösung löslich sind. Um die Frage zu entscheiden, wurde die Lösung mit Wasser verdünnt. Der dadurch entstandene Niederschlag bestand nach dem Auswaschen nicht nur aus Stroma, sondern aus Metall und Stroma. Ganz dasselbe war der Fall, als ich die Stromata in verdünnten Alcalien

auflöste und dann zu fällen versuchte: es trat keine ordentliche Fällung ein.

2. Serumfällungen.

Um die Wirkung festzustellen, welche von den Schwermetallsalzen auf das Blutserum ausgeübt wird, wurde mir von Prof. Robert Katzenblutserum freundlichst zur Verfügung gestellt, Pferdeblutserum gewann ich selbst bei der Darstellung von O^2Hb literweise. Das Serum wurde vor den Versuchen durch Absetzenlassen in Eiswasser und nachheriges Centrifugiren von den rothen Blutkörperchen vollständig befreit, so dass in ihm spectroscopisch kein Hb mehr nachweisbar war. Das vollkommen klare, etwas gelblich gefärbte Pferdeblutserum, sowie das klare, kaum weisslich opalisirende Katzenblutserum versetzte ich unverdünnt mit 1:100 bereiteten Salzlösungen der Schwermetalle und beobachtete, dass sowohl die Serumeiweissstoffe des Pferde- wie auch des Katzen-serums gefällt werden:

1. Von allen löslichen Kupferoxydsalz- und Kupferdoppelsalzlösungen. Der Niederschlag ist blauweisslich und löst sich nach vollständigem Auswaschen in 5 pCt.-ger Kochsalzlösung zu einer schwach opalisirenden Lösung auf; fügt man dieser Lösung noch eine Spur Ammoniaklösung hinzu, so wird die Lösung wasserklar.

2. Von allen löslichen Zinesalzlösungen und deren Doppelsalzen. Der Niederschlag ist gelblich und löst sich nach vollständigem Auswaschen unter denselben Bedingungen auf, wie der Kupferniederschlag.

3. Uranacetat und Urannitrat fällen Serumeiweiss nur in sehr grossem Ueberschusse. Nach Zusatz von etwas Uransalzlösung entsteht ein Niederschlag, welcher sich beim Umschütteln oder Verdünnen mit Aq. destillata auflöst. Der beim grossen Uransalzüberschusse entstehende gelblich weisse Niederschlag ist in Aq. destillata nicht mehr löslich, wohl aber löst er sich unter denselben Bedingungen wie die Zn- und Cu-Niederschläge auf.

4. Nickelsulfat fällt Serum nur theilweise, grünlich weisslich. Der Niederschlag löst sich nicht vollständig unter den Bedingungen des Cu-Niederschlages.

5. Cobaltsulfat fällt Serum nicht, sondern erzeugt nur eine Spur Trübung.

6. Mangansulfat fällt Serum nicht.

7. Eisenoxydsulfat fällt Serum nicht.

8. Eisenoxydsulfat sowie Eisenchlorid fallen Serum gelblich roth, der Niederschlag ist unter den Bedingungen, wie der Cu-Niederschlag leicht löslich und enthält nach vollständigem Auswaschen und Trocknen bei 110° C. 3.2 pCt. Fe chemisch gebunden.

9. Quecksilbersalze fallen Serum schneeweiss. Der Niederschlag ist unter den Bedingungen, wie Cu-Niederschlag, löslich.

10. Platinchlorid fällt Serum gelblich-weiss; der Niederschlag ist weder in verdünntem Ammoniak noch in $\text{NaCl} + \text{NH}_3$ vollständig löslich.

11. Silbernitrat fällt Serum gelblich-weiss, der Niederschlag ist unter den Bedingungen, wie Cu-Niederschlag, schwerlöslich.

12. Bleisalze fallen Serum unvollständig; die Niederschläge sind in Chlornatriumlösung $+$ Spur Ammoniak nicht vollständig löslich.

13. Natrium wolframicum fällt Blutserum unvollständig, weiss. Der Niederschlag ist in $\text{NaCl} +$ Spuren NH_3 unlöslich.

14. Ammon. molybdänicum verhält sich ähnlich dem Natrium-wolframat.

15. Bismuth. nitric. neutrale, sowie Bismuthum citricum ammoniacale, fallen Serum unvollständig weisslich gelb. Der Niederschlag ist in $\text{NaCl} + \text{NH}_3$ schwerlöslich.

16. Cadmiumchlorid und das Sulfat fallen Serum unvollständig gelb; der Niederschlag ist in 5 pCt-ger Chlornatriumlösung leichtlöslich.

17. Zinnchlorür fällt Serum anfangs weiss käsig, durch Wasserzusatz wird der Niederschlag wieder aufgelöst.

18. Kaliumbichromat und Kaliumchromat fallen Serum unvollständig gelb. Der Niederschlag ist in $\text{NaCl} + \text{NH}_3$ nur theilweise löslich.

19. **Thalliumcarbonat** fällt Serum nur spurweise. Gegen verdünnte Schwefelammoniumlösung verhalten sich die vollständig ausgewaschenen Serumniederschläge folgendermassen:

Uran und Hg—: löslich mit gelber Farbe.

Cu: löslich mit grüner Farbe.

Ni: schwerlöslich.

Co: unlöslich, zersetzlich.

Zn: leichtlöslich, gelbe Farbe.

Eisenoxydsulfat löslich mit gelber Farbe.

Pt—: schwerlöslich, mit gelber Farbe.

Ag—: leichtlöslich, mit braungelber Farbe.

Cd—: leichtlöslich, mit prachtvoll goldgelber Farbe.

Bi—: schwerlöslich, mit gelber Farbe.

Sn—: schwerlöslich, mit gelblicher Farbe.

Durch viel Wasser oder wenig Säure sind die Niederschläge aus Schwefelammoniumlösung nicht mehr unzersetzt ausfällbar.

Wie aus dem Vorhergehenden ersichtlich, machte ich die Beobachtung, dass das von Harnack⁵⁾ als indifferent angegebene und auch von Klemptner⁵⁾ bei seiner Arbeit gebrauchte Doppelsalz, das weinsaure Kupferoxyd-Natrium, sich garnicht so indifferent gegen Blutserum verhält, als von Harnack und Klemptner behauptet wird.

Klemptner⁵⁾ führt in seiner Arbeit pag. 12 an, dass er beim Versetzen von 10 ccr. Pferdeblutserum mit der conc. Lösung (10 pCt.) von weinsaurem Kupferoxydnatrium selbst nach 24 Stunden keinen Niederschlag erhalten hat. Das ist ganz richtig. Doch hat er aber übersehn, dass beim Hinzufügen der conc. Doppelsalzlösung zum Serum beim Zusammenkommen eines jeden Tropfens mit Serum ein grünlichweisser Flocken entsteht, welcher sich momentan wieder auflöst, so dass das Serum beim Durchschütteln vollständig klar bleibt und auch nach längerem Stehen keinen Niederschlag fallen lässt. So verhält sich das Serum gegen überschüssige conc. weinsaure Kupferoxydnatrium Lösung; fügt man dagegen zum Serum eine 1:100 verdünnte Lösung von Kupferoxyd-Natriumtartrat, so entsteht ein wunderschöner, bläulich-weisslicher Niederschlag, der sich erst nach

völligem Auswaschen in 2 pCt.-ger Kochsalzlösung nach Zusatz von Spuren Ammoniak wieder auflöst; ebenso löst sich der Niederschlag auch theilweise nach Zusatz von viel Serum wieder auf. Nun ist es aber sehr wichtig zu wissen, dass gerade verdünnte Lösungen dieses Kupferdoppelsalzes fällend auf Serum einwirken, weil bei allen solchen Thierversuchen, wie Klemptner etc. ausgeführt haben, wohl schwerlich conc. Lösungen zu gebrauchen sein werden.

Dass aber Klemptner⁵⁾, trotzdem dass das Serum von dem Doppelsalze gefällt wird — beim Eintrocknen und Veraschen des Rückstandes von 20 cem. Serum keine Spur von Kupfer fand, in 12 cem. Blutkörperchen aber das Cu deutlich nachweisen konnte, pag. 49, kann dadurch erklärt werden, weil, wie wir später sehen werden, das Hb zum Cu und anderen Schwermetallen grössere Energie hat als Serumeiweissstoffe und alles Cu solange an sich zieht, bis alles Hb gebunden ist. Da aber nie soviel Cu ins Blut gespritzt wird, das alles Hb gebunden werden kann, so ist es selbstverständlich, dass im Serum kein Cu gefunden werden konnte, es sei denn dass man das Serum nicht vollständig von den Blutkörperchen befreit hat, oder dass noch einige Flocken von gebundenem Cu O²Hb darin herumschwimmen,

Was hier von Cu und Cu-doppelsalzen gesagt ist, gilt auch für Zink und andere Schwermetalle, die mit Serum und O²Hb Verbindungen eingehen.

Ich weiss wohl, dass Serum im chemischen Sinne keine einheitliche Substanz ist, sondern wenigstens aus zwei Eiweissstoffen, von verschiedenen Eigenschaften besteht. Für die angeführten Betrachtungen schien es mir aber nicht nöthig zu sein, diese beiden Stoffe zu isoliren. Soviel ich aus den Fällungen ersehn konnte, werden wohl alle Eiweissstoffe des Serums bei genügendem Zusatz von Metallsalzlösungen gefällt.

3. Serumtitrationen.

Um festzustellen, wie viel das Blutserum überhaupt chemisch von den Metallen zu verbinden mag oder zur Fällung gebraucht, nahm ich einige Titrationen desselben mit 1:100 Zink- und

Kupfersalzlösungen vor. Jedoch konnte ich hier zu keinem genauen Resultate gelangen, weil die Zn- und Cu-Salz-Niederschläge mit unverdünntem Serum sich sehr langsam und unvollständig zu Boden setzen. Wollte man aber das Serum mit Aq. destillata verdünnen, so wurde schon durch dasselbe ein Theil der Serum-eiweissstoffe gefällt, so dass man keine Controlle hatte, wie viel von den Metallen gefällt worden war. Verdünnte ich aber das Serum mit physiologischer Kochsalzlösung, so blieb das Serum wohl klar, aber liess sich jetzt durch die Salze der Schwermetalle nur theilweise fällen. Dasselbe war der Fall, als ich das Serum durch verdünnte Alcalien verdünnen wollte.

4. Blutfarbstofffällungen.

Bei den Blutfarbstofffällungen ist es ganz gleichgültig — wie schon (Grahe⁴) angegeben — ob das Blut alt oder frisch ist, von Stromata und Serum befreit wird oder nicht. Auch ist es einerlei von welchem Thiere und Thierart das Blut genommen wird. — Nur muss man, um gute und rasche Fällungen zu bekommen, defibriniren und wenigstens 1:100 mit Aq. destillata verdünnen.

Ich nahm eine Reihe Fällungen mit defibrinirtem, frischem Hundeflut und etwas älterem Rinderblut vor, um festzustellen, mit welchen Schwermetallen der Blutfarbstoff sich überhaupt fällen lässt. Dabei constatirte ich, dass der Blutfarbstoff gefällt wird:

I. Von allen mir zur Verfügung gestandenen Zinksalzen wie: Zincum nitricum, Zincum sulfuric., Zinc. aceticum, arsenicum, aethylicum, sulfurosum, cyanatum, phenylicum, jodicum, oxydatum, phosphoricum, tartaricum, albuminatum, lacticum, citricum, hypophosphorosum, weinsaures Zn-O-Natrium, die Niederschläge vorhergehender Salze sind anfangs scharlachroth, werden aber beim Stehen und Auswaschen etwas dunkler.

Ferner fallen das Hb: Zincum oleicum, bronnicum, bromatum, rhodanatum, formicicum, jodatum, salicylicum, chloratum, valerianicum, sulfocarbolicum, sozodolicum, sulfothymolicum, carbonicum.

Die Niederschläge sind ziegelroth bis chocoladenbraun gefärbt.

Sehr leicht treten die Fällungen mit den leichtlöslichen Zinksalzen ein, während man mit den in Aqua schwerlöslichen Salzen manchmal tagelang jeden Tag mehrere Stunden schütteln muss, ehe man zum Resultate kommt.

Die Angabe Grahes⁴⁾ dass er mit Zincum phosphoricum, — carbonicum etc. keine Fällung erhalten hat, beruht wahrscheinlich darauf, dass er zu kurze Zeit die Schüttelungen fortgesetzt hatte.

Ein Zusatz von 1—2 pCt. Natr.-chlorat, -sulfuric. oder -nitricum zu der Blutlösung beschleunigt das rasche Absetzen, weil die Niederschläge in Neutralsalzlösungen sehr schwer löslich sind. Besonders zu empfehlen ist der Zusatz bei Metallsalzlösungen wo es angeht, von Kochsalzlösung, weil die Eiweissstoffe, die ausser dem O²Hb im Blute sich befinden, in Chlornatriumlösung löslich sind und dann selbst beim Ueberschusse von Metall fast gar nicht gefällt werden, so dass man den Blutfarbstoff allein entfernen kann.

Ein Beweis dafür, dass die Eiweissstoffe ungefällt bleiben und dass Hb eine grössere Energie zu den Schwermetallen hat, als die eigentlichen Eiweissstoffe, ist ja auch der, dass man den Blutfarbstoff durch Zinkalbuminat, Kupferalbuminat fällen kann, was ja nicht der Fall sein könnte, wenn beide gleichgrosse Energie besässen.

Deshalb that Prof. Kobert sehr richtig, wenn er in seinem Lehrbuche der Intoxicationen, Stuttgart 1893, pag. 88, zur Isolirung der Toxalbumine, Toxopectone, sonstigen giftigen Eiweissstoffen und Alcaloiden etc. aus dem Blute, zuerst zur Entfernung des lästigen, störenden Blutfarbstoffes die Zinkfällung empfiehlt.

II. Ganz ebenso wie mit den Zinksalzen lässt sich der Blutfarbstoff auch mit allen möglichen Kupfersalzen fällen, so durch: Cuprum sulfuricum, — benzoicum, — oxydat. hydricum, — boracicum, — chloricum, — phosphoricum, — citricum, — oleinicum, — cyanatum, — albuminatum, — bromatum, — formicicum, — tartaricum, — sulfophenylicum, — salicylicum, — rhodanatum, — sulfurosum, — jodatum, — acetum neutrale, weinsaures Kupferoxydnatrium etc.

Die Kupferniederschläge sind je nachdem, ob sie weniger oder mehr voluminös sind, grauweisslich bis rothbraun gefärbt. Nach dem vollständigen Auswaschen, Trocknen und Pulvern sind sie alle chocoladenbraun. Da die Kupferverbindungen des Hb in Neutralsalzlösungen noch schwerer löslich sind, als die Zinkverbindungen, so entstehen die Niederschläge mit den Kupfersalzen rascher, als mit Zinksalzen. Jedoch beschleunigt auch hier ein Zusatz von Chlornatrium oder sonstigen Neutralsalzen der Alcalien das rasche Absetzen. Mit den schwerlöslichen Kupferverbindungen muss man ebenfalls sehr lange und anhaltend die Blutlösung schütteln um zum Resultate zu kommen.

Bei den folgenden Versuchen mit den übrigen Schwermetallen habe ich nur mit leichtlöslichen Salzen experimentirt, um Zeit und Material zu ersparen; denn wie man aus den Versuchen mit Zink- und Kupfersalzen schliessen kann, würde man auch mit den schwerlöslichen Salzen der übrigen Metalle Niederschläge erzielen können.

III. Silbernitrat fällt Blutlösungen braunroth, ein Zusatz von Natr. nitric. beschleunigt den Niederschlag.

IV. Cadmiumsulfat und Cadmiumchlorid fallen Blutlösungen kaffeebraun, ein Zusatz von NaCl oder Na_2SO_4 beschleunigt den Niederschlag.

V. Quecksilberchlorid fällt Blutlösungen rothbraun, ein sehr kleiner Zusatz von NaCl oder NaNO_3 beschleunigt das Absetzen.

VI. Zinnchlorür fällt Blutlösungen schwarzbraun, ein Zusatz von NaCl beschleunigt den Niederschlag.

VII. Plumbum aceticum neutr. und Plumbum nitric. fallen Blutlösungen rothbraun nach Zusatz von NaNO_3 .

VIII. Eisenoxydsulfat fällt Blutlösung schwarzbraun nach Zusatz von Na_2SO_4 , MgSO_4 oder NaCl.

IX. Bismuth. nitric. neutrale und Bismuth. citricum ammoniacale fallen Blutlösungen chocoladenbraun, ersteres ohne jeglichen Zusatz, letzteres nach Zusatz von NaNO_3 .

X. Ammonium molybdaenic. fällt Blutlösung nach Zusatz von NaCl schwarzbraun.

XI. Platinchlorid fällt Blutlösungen ohne jeglichen Zusatz weisslich grau.

XII. Manganoxysulfat fällt Blutlösungen nach Zusatz von NaOH oder Na_2CO_3 röthlich braun.

XIII. Goldchlorid fällt Blutlösungen unvollständig.

XIV. Cobaltoxydulsulfat fällt Blutlösungen dunkelroth, nach Zusatz von Spuren NH_3 oder Na_2CO_3 .

XV. Nickeloxysulfat fällt Blutlösungen dunkelroth, unter denselben Bedingungen wie Cobalt.

XVI. Kaliumbichromat fällt Blutlösungen graubraun nach Zusatz von NaCl oder Na_2SO_4 .

XVII. Uranacetat und Urannitrat fallen Blutlösungen dunkel-roth nach Zusatz von NaCl.

Keine ordentlichen Fällungen gelangen mir mit:

Manganoxysulfat, Eisenoxysulfat, Kaliumchromat, Natriumwolframat und Thalliumcarbonat. Doch scheinen auch diese mit dem Blutfarbstoffe eine Verbindung einzugehen, so viel man aus der Farbenveränderung der Blutlösung nach Zusatz von diesen Salzen darauf schliessen kann. Wie man aus dem Vorhergehenden sieht, geht der Blutfarbstoff mit den meisten bekannten Schwermetallen Verbindungen ein.

Jetzt war aber interessant zu erfahren, ob zwischen Hb und den verschiedenen Metallen auch bestimmte quantitative Verhältnisse beim Füllen stattfinden, das heisst, ob diese Niederschläge als chemische Verbindungen oder nur als mechanische Gemische anzusehen sind. Um auf diese Frage eine vorläufige Antwort zu finden und zu gleicher Zeit auch der Aufforderung Prof. Koberts — den Hb Gehalt des Blutes titrimetrisch zu bestimmen versuchen — nachzukommen, führte ich mit leichtlöslichen und constant zusammengesetzten Zink- und Kupfersalzlösungen einige Hundert Titrirversuche aus, wobei ich mir die Voraussetzung machte, dass wenn das Hb einer bestimmten Blutlösung von bekanntem Procentgehalt, mit verschiedenen Zinksalzen titrirt, immer eine bestimmte, ganz constante Menge Zn zur Fällung bedarf, — wenn dann dieselbe Blutlösung, mit verschiedenen Kupfersalzen titrirt ebenfalls immer eine bestimmte und constante Cu-Menge zur Fällung bedarf, gleichgültig, welches Cu-salz zur

Fällung gebraucht worden ist, und wenn dann zuletzt die zur Fällung gebrauchten Zn- und Cu-Mengen einander noch äquivalent sind oder in einem bestimmten Verhältnisse stehen, so wäre damit bewiesen, dass die Niederschläge, welche die Metallsalzlösungen erzeugen, vollständige chemische Individuen sind und keine mechanischen Gemenge.

Ich stellte mir aus frischem defibrinirtem, aber stromata- und serumbhaltigen Hundeblut eine Lösung 1:100 dar, filtrirte dieselbe durch, um eventuelle mechanische Beimengungen daraus zu entfernen und eine klare Flüssigkeit zu haben — und führte mit Zink und Kupfersalzlösungen 1:100 und 1:1000 mehrere Hundert Titrirversuche aus, kam aber ganz ebenso wie Klemptner zu keinen einheitlichen Resultaten. Und zwar deshalb nicht — wie es sich bei weiteren Versuchen herausstellte —, weil der Niederschlag durch die schleimige Beschaffenheit der Serum- und Stromata-Eiweissstoffe so fein und lange in der Lösung suspendirt blieb, dass erst nach tagelangem Stehen und mehrmalige Filtration durch dreifache Filter das Filtrat klar erhalten wurde, was natürlich das Arbeiten sehr erschwerte und den Eintritt von vollständiger Fällung richtig zu beobachten verhinderte.

Ich musste desshalb darauf bedacht sein, diese Hindernisse mir aus dem Wege zu schaffen. — Nach wochenlangem Herumprobiren und hunderten von Versuchen gelang es mir endlich eine Methode zu finden, die mir erlaubte rasche und gute Fällungen des Hb zu erzielen, ohne dass die Serum- oder Stromata-Bestandtheile mitgefällt wurden oder hindernd dem Absetzen des Niederschlages in den Weg traten.

5. Haemoglobintitrationen.

Ich fand nämlich, dass, wenn man auf 10 ccm. frischen Blutes 2 ccm. einer 30 pCt. Kochsalzlösung und 2 Tropfen einer 20 pCt. Ammoniaklösung hinzufügt, durchschüttelt und dann das Blut 1:100 mit aq. destill. verdünnt, absetzen lässt und filtrirt, so kann man diese Blutlösung mit 1:1000 bereitetem Zink-, Kupfer-, Cadmium-, Uranlösung etc. titiren, ohne dass diese Metalle mit Serum resp. Stromatabestandtheilen sich eher verbinden,

bis alles O^2Hb gefällt ist. — Diese Thatsache fand ich dadurch, dass ich ein Gemisch von reinem Serum und Stromatabestandtheilen mit einer bestimmten Menge reiner O^2Hb -Lösung versetzte und titrimetrisch nachzuweisen versuchte, ob zur Fällung der bekannten O^2Hb Menge in diesem Gemisch nur soviel Zn, Cu etc. nöthig ist, wie zur Fällung einer ebenso grossen Menge O^2Hb in Aq. destillata. Da fand ich dann, dass nach Zusatz von bestimmter Menge Chlornatrium und Ammoniak das O^2Hb aus dem Serum und Stromata-Gemische sich factisch mit ebensoviel Cu etc. fällen liess, als aus der reinen wässrigen Lösung. Auf diese Beobachtung basirend ging ich folgender massen vor: Ich bestimmte zuerst für irgend ein Blut die Menge des Zn oder Cu, welche nöthig war um das O^2Hb des normalen Blutes vollständig zu fällen; darauf verdünnte ich die Blutlösung beliebig und probirte nachzuweisen, ob die Menge des Metalls, welche eine verdünntere Blutlösung zur Fällung des O^2Hb nöthig hatte, der Verdünnung proportional blieb, was jedes Mal der Fall war.

Dadurch ermuthigt nahm ich die titrimetrische Bestimmung des Hb einiger Blutarten vor:

Ich nahm ein Gestell mit neun gleichgrossen Reagensgläsern, füllte in jedes Glas 10 ccm. einer filtrirten Blutlösung 1:100, welcher ich vorher die vorne angegebene Menge Chlornatrium und Ammoniak zugesetzt hatte.

In das fünfte Reagensglas in der Mitte wurde soviel einer 1:1000 bereiteten Metallsalzlösung hinzugefügt, als es nöthig gewesen wäre um alles O^2Hb zu fällen, wenn das zu untersuchende Blut genau 10 pCt. O^2Hb enthalten würde.

In die vier Gläser rechts wurde dann aufsteigend immer in jedes Glas 1 ccm. mehr von der Metallsalzlösung zugesetzt, als im vorhergehenden vorhanden war, während in die vier Gläser links wieder ansteigend immer 1 ccm. weniger zugesetzt wurde, als im vorhergehenden vorhanden war, z. B.:

3	4	5	6	7	8	9	10	11	ccm.
I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	Reag.-gl.

Alle wurden scharf durchgeschüttelt und auf 6 Stunden in die Kälte gestellt. Darauf wurde nachgesehen, wo die Fällung voll-

ständig geworden war. Von diesem Glase aus wurde dann absteigend halb-cmm.-weise Metallsalzlösung hinzufügend solange weiter titirt, bis das Minimum des fallenden Metalles, die Grenze der Fällung erreicht worden war. Zur Controlle, dass kein Ueberschuss des Metalls mehr vorhanden war, wurde ein Theil des wasserhellen Filtrats mit einer verdünnten, filtrirten Blutlösung zusammengebracht — wie auch Klemptner⁵⁾ es gethan hatte — und nachgesehen, ob dadurch in der Blutlösung noch eine Trübung hervorgerufen wird. Der andere Theil des Filtrates wurde mit rauchender Salpetersäure resp. conc. Schwefelsäure gekocht, um organische Verbindungen zu zerstören, die überschüssige Säure abgestumpft und mit Ferrocyankalium auf die Anwesenheit von Zn oder Cu geprüft. Traten beide Controllversuche negativ auf, so war man sicher, dass kein Metallüberschuss vorhanden war und diese Metallmenge wurde dann für diese Blutart als genügend notirt.

Auf diese Weise fand ich, dass:

I. 100 ccm. Hundeblut zur Fällung des O²Hb's 0.2325 Zn und 0.2259 Cu bedürfen.

II. 100 ccm. Kalbsblut brauchten 0.235 Zn und 0.2276 Cu.

III. 100 ccm. Hühnerblut brauchten 0.39 Zn u. 0.379 Cu.

IV. 100 ccm. Sectionsleichenblut von einem Ertrunkenen brauchten 0.357 Zn und 0.346 Cu.

V. 100 ccm. Sectionsleichenblut von einem an Alcoholvergiftung gestorbenen brauchten 0.4983 Cu und 0.5135 Zn.

VI. 100 ccm. Katzenblut brauchten 0.245 Zn u. 0.24 Cu.

VII. 100 ccm. Hechtblut brauchten 0.0349 Zn u. 0.034 Cu.

VIII. 100 ccm. Pferdeblut brauchten 0.311 Zn u. 0.301 Cu.

IX. 100 ccm. frisches Menschenblut brauchten 0.323 Zn und 0.313 Cu.

X. 100 ccm. Iltisblut brauchten 0.2109 Cu und 0.2178 Zn, um völlig das O²Hb zu fällen.

Um aus diesen Zahlen den O²Hb-gehalt des Blutes berechnen zu können, hatte ich schon früher titrimetrisch an chemisch-reinen O²Hb Lösungen von bekanntem Gehalte festgestellt, dass O²Hb zur vollständigen Fällung 2.33 pCt. Zn und 2.25 pCt. Cu bedarf. Diese Zahlen benutzend berechnete ich aus

den oben bei Bluttitationen gefundenen Zn und Cu Mengen den O²Hb-gehalt der angeführten Blutarten nach folgenden Gleichungen:

1. 2.33 Zn brauchten 100.0 O²Hb zur Fällung, die gefundene Menge Zn braucht x Gramm O²Hb zur Fällung, also $2.33 : 100 = \text{gefundene Zn Menge} : x$; $x = \text{der O}^2\text{Hb-gehalt von 100 ccm. Blut.}$

2. $2.25 : 100 = \text{gefundene Cu Menge} : x$, z. B. 100 ccm. Iltisblut brauchten 0.2109 Cu zur Fällung, führt man diese Zahl in obige Gleichung ein, so findet man:

$$2.25 : 100 = 0.2109 : x = 9.3318 \text{ pCt. O}^2\text{Hb in Iltisblut.}$$

Man braucht aber nie 100 ccm. Blut um diese Titationen auszuführen, mit 1 oder 2 ccm. kommt man vollkommen aus. Ich habe zu diesen Titationen immer nur 1 ccm. Blut auf 100 ccm. mit Aq. destillata ergänzt und bin mit dieser Flüssigkeit sehr gut ausgekommen. Die gefundenen Zahlen habe ich auf 100 ccm. Blut umgerechnet, damit man gleich den O²Hb-gehalt des Blutes aus der angeführten Gleichung bekommt. Man kann aber jede beliebige Menge Blut dazu gebrauchen, man hat aber dann zweimal eine Gleichung anzusetzen, um den Procentgehalt des O²Hb zu erhalten. Z. B.: 0.3 Gramm Iltisblut bedürfen zur Fällung des O²Hb 0.0006328 Cu, daraus berechnet man zuerst wie viel O²Hb in 0.3 Gramm Blut vorhanden ist, indem man folgende Gleichung aufstellt:

$$2.25 : 100 = 0.0006328 : x = 0.028 \text{ Gramm O}^2\text{Hb in 0.3 Gramm Iltisblut.}$$

Daraus berechnet man den Procentgehalt nach folgender Gleichung:

$$0.3 : 0.028 = 100 : x = 9.33 \text{ pCt. O}^2\text{Hb.}$$

Im Nachstehenden führe ich meine titrimetrisch bestimmten O²Hb Procente einiger Blutarten vergleichend mit den von anderen Autoren, nach anderen, spectroscopischen und colorimetrischen Methoden gefundenen Procenten an.

Vergleichende Tabelle
der O²Hb-Zahlen verschiedener Autoren.

Blut von :	O ² Hb-gehalt in % nach Jutt.		O ² Hb- gehalt in % nach Georgen- burger. ²⁾	O ² Hb- gehalt in % nach Müller. ¹⁾	Bemerk- ungen.
	Titriert mit Zn	Titriert mit Cu.			
Hund.	9.979%	9.995%	10.39%	9.7%	
Rind.	10.085 »	10.070 »	10.93 »	9.9 »	
Hahn	16.74 »	16.76 »	16.15 »	16 - 17 »	
Leichenblut von ei- nem Ertrunkenen .	15.321 »	15.31 »	17.66 bis 26.49%	—	
Leichenblut von ei- nem an Alcoholver- gift. gest.	22.038 »	22.048 »	—	—	
Mensch.	13.862 »	13.938 »	—	13.77 »	
Katze	10.515 »	10.519 »	10.610 »	—	
Pferd.	13.317 »	13.318 »	11 »	13.1 »	
Hecht	1.497 »	1.5 »	—	—	
Ittis	9.340 »	9.331 »	—	—	
Schwein.	—	13.320 »	12.66 »	12.7 »	
Schaf	—	—	—	10.3 »	

Wie man aus der Tabelle ersieht, bekommt man nach der vorhinbeschriebenen Methode, Titrimethode, Zahlen, die verhältnissmässig ganz gut mit den nach anderen Methoden gefundenen Ziffern übereinstimmen.

Ausserdem ist noch Aussicht vorhanden, dass diese Methode noch vervollständigt werden kann. Denn Uran und Cadmium scheinen noch präciser den Blutfarbstoff zu fällen als Zn und Cu. Zink eignet sich weniger gut zum Titriren, weil die Niederschläge sehr voluminös sind und weniger rasch sich absetzen,

als Cu, Cd.- und Uranniederschläge. Leider war es mir nicht möglich die Methode mit Cd.- und Ur.-Salzen näher auszuarbeiten, weil theils meterielle Schwierigkeiten, theils Zeitmangel mich daran verbanderten. Doch hoffe ich das Versäumte in der nächsten Zeit nachholen zu können.

Wenn man in Betracht zieht, dass die meisten Hb-gehalt-Bestimmungsmethoden entweder auf colorimetrischen oder spectroscopischen Intensitätsmessungen resp. Vergleichen der durch O²Hb roth gefärbten Flüssigkeiten beruhen, so ist es garnicht so unwahrscheinlich, dass man titrimetrisch den O²Hb-gehalt einer Flüssigkeit genauer bestimmen kann, als nach den anderen Methoden, weil ja bekanntlich der Farbensinn mehr oder weniger individuellen Schwankungen unterworfen ist und sogar gänzlich fehlen kann, wodurch sich doch Fehler einschleichen können.

Ausserdem sind die Farbenintensitäten der verschiedenen O²Hb nach Hoppe Seyler ¹⁷⁾ pag. 375 in gleich conc. Lösungen nicht gleich stark.

Bei der titrimetrischen Methode kommt es auf den Farbensinn garnicht an, man hat dabei nur darauf zu achten, wann die überstehende Flüssigkeit wasserhell oder farblos geworden ist. Diese Schlussreaction ist ja leicht zu erkennen, weil es wohl schwerlich Jemanden geben wird, der eine farblose, wasserhelle Flüssigkeit nicht für eine solche ansieht.

Ausserdem sind hier verschiedene chemische Controllen möglich, um festzustellen, ob man nicht einen Ueberschuss vom Metall genommen hat, während der Arbeitende, mit den Farbenintensität vergleichenden Apparaten, oft sich selbst nicht controliren kann und unsicher bleibt.

Auch sind die Spectralapparate etc. sehr kostspielige Sachen, so dass nicht ein jeder Arzt im Stande ist, solche sich anzulegen, während man zur Titration nur 9 Reagensgläser und ein kleines Masscylinder und eine graduirte Pipette nöthig hat, was zusammen höchstens 2—3 Rubel ausmacht.

III.

Darstellung, Eigenschaften und Zusammensetzung des chemisch-reinen Pferdeblut-Oxyhaemoglobins.

Da die rothen Blutkörperchen des Pferdeblutes sich leicht absetzen und gut sich vom Serum befreien lassen und, um mit Zinoffsky ¹¹⁾ vergleichbare Zahlen zu bekommen, habe ich Pferdeblut zur O²Hb Gewinnung benutzt.

Die Darstellung der Krystalle geschah nach folgender, sehr brauchbaren und bequemen, von Prof. Alex. Schmidt angegebenen und vom Doc. Dr. Fr. Krüger dahin modificirten Methode, dass man das Blut nicht vorher zu defibriniren braucht: «Das Blut wurde direct vom Pferde in mit Eis und Kochsalzmischung abgekühlte hohe Glasylinder abgezapft und ohne es vorher zu defibriniren in Eis gestellt, damit die Gerinnung nicht so schnell eintritt und die rothen Blutkörperchen Zeit haben sich abzusetzen, was gewöhnlich nach 12—24 Stunden geschehen ist. Nachdem dann das ganze Blut geronnen war, wurde es aus dem Glasylinder auf einen langen Teller herausgenommen und das oben abgestandene gelblich weisse, blutkörperchenfreie geronnene Serum an der Grenze des Blutkörperchenkuchens abgeschnitten. — Die rothen Blutkörperchen wurden nun durch ein Handtuch gepresst, wobei die geronnenen Serumbestandtheile auf dem Handtuche zurückblieben. Der flüssige Blutkörperchenbrei wurde darauf mit dem 2-fachen Volum kalten destillirten Wassers vermennt und zu der so erhaltenen Flüssigkeit solange vorsichtig, unter stetem Umrühren, tropfenweise $\frac{1}{10}$ Normalammoniaklösung — deren Gehalt genau gegen $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure eingestellt worden war — hinzugefügt, bis die rothen Blutkörperchen sich auflösten und die Farbe der Flüssigkeit auf der Spitze eines Quecksilberthermometers oder eines mit Quecksilber gefüllten Reagensglases betrachtet, vollständig klar, durchsichtig und lackfarben geworden war, ein Zeichen dass die Blutkörperchen alle aufgelöst waren. Hierauf

wurde sofort von der $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure unter denselben Vorichtsmassregeln wie bei Ammoniak, tropfenweise genau soviel zur Blutkörperchenlösung hinzugefügt, als zur völligen Neutralisation des vorher hinzugefügten Ammoniaks erforderlich war. Nach der Neutralisation wurde gleichfalls unter stetem Umrühren, tropfenweise sehr vorsichtig $\frac{1}{3}$ Volumen — auf die jetzt vorhandene Flüssigkeit berechnet — gut abgekühlten 96 pCt. Spiritus zugesetzt, solange bis der beim Hineinfallen eines jeden Alcoholtropfens entstandene Flocken sich nicht mehr sofort auflösen wollte. Die so behandelte Blutkörperchenlösung wurde dann in hohe Glaszylindergefässe gegossen und in Eis und Kochsalzmischung zum Auskrystallisiren des O²Hb gestellt. — Waren nach 24 Stunden noch keine Krystalle ausgeschieden oder nur spärlich vorhanden, dann wurden einige Kohlensäurebläschen durch die Flüssigkeit hindurch streichen gelassen, um die etwa vorhandenen letzten Spuren von Alcalien, welche störend auf die Krystallisation wirken, zu neutralisiren, — die Flüssigkeit darauf mit einem Glasstabe umgerührt und wiederum in Eis-Kochsalzgemisch gestellt.

Nach abermals 24 Stunden war dann die ganze Flüssigkeit zu einem Krystallbrei erstarrt.

Um grössere Krystalle zu erhalten und die Mutterlauge von den Krystallen besser entfernen zu können, wurden die Krystalle mit einem Glasstabe nochmals tüchtig durchgerührt und wiederum in Eis zum Absetzen gestellt.

Nach 2—3 Tagen wurde dann die Mutterlauge durch ein Handtuch möglichst von den am Boden liegenden Krystallen abgegossen, die Krystalle auf demselben Handtuch gesammelt und im Eisschrank abtropfen gelassen.

Darauf wurde der Krystallbrei vom Handtuch abgenommen, in die Centrifuge gebracht, vollständig darin von der Mutterlauge befreit und darauf 3—4 Mal mit ebensoviel eiskaltem destillirtem Wasser, als Krystalle vorhanden waren, aufgeschüttelt und in der Centrifuge gewaschen.

Die so gewonnenen, noch nicht völlig reinen Krystalle wurden mit dem 2-fachen Volumen destillirten Wassers vermischt und zum Zwecke der Umkrystallisation derselben Procedur unterworfen, wie vorher die rothen Blutkörperchen.

Nach jedesmaliger Umkrystallisation wurden kleine Proben unterm Mikroscope untersucht. Solange Stromatabestandtheile und Verunreinigungen noch vorhanden waren, erschienen die Krystalle wie mit Locheisen durchstochen und unregelmässig ausgebildet.

Eine dreimalige Umkrystallisation und darauf folgendes mehrmaliges Waschen mit eiskaltem destillirten Wasser genügten, um vollkommen stromatafreie, sehr reine und schön ausgebildete Krystalle zu erhalten, die in destillirtem Wasser aufgelöst, ein prachtvolles, von jedem Zersetzungsproducte freies O^2Hb Spectrum zeigten».

Nach dieser eben geschilderten Methode hatte Herr Docent Dr. Fr. Krüger im physiologischen Institute die Liebenswürdigkeit, persönlich mir aus einem Liter Pferdeblut krystallisirtes O^2Hb darzustellen, um zu gleicher Zeit mir zu zeigen, wie man bei der Darstellung des O^2Hb zu verfahren hat. Es wurden aus einem Liter Pferdeblut 50 gramm O^2Hb erhalten, welches ich zu Vorversuchen verbrauchte.

Da ich viel O^2Hb zu meinen Untersuchungen und Praeparaten brauchte und es immer frisch haben musste, so richtete ich die Darstellung so ein, dass ich im Verlaufe von je 3 Wochen immer wieder eine Portion fertig hatte, damit keine Stockung in der Arbeit eintreten konnte.

In der heissesten Sommerzeit arbeitend, konnte ich nicht die O^2Hb Krystalle — wie im Vorhergehenden beschrieben, auf dem Handtuche von der Mutterlauge befreien, weil das Abtropfen zu lange dauerte und die Krystalle selbst im Eisschrank zu schmelzen anfangen, wodurch man viel Verlust gehabt hätte.

Durch Abhebern lässt sich die Mutterlauge aber noch viel weniger ohne grössere Verluste des O^2Hb von den Krystallen weg-schaffen, weshalb ich jedes Mal die Krystalle in der Centrifuge von der Mutterlauge befreite. — Ferner änderte ich die Methode noch in sofern ab, dass ich den, durch das Handtuch gepressten Blutkörperchenbrei nochmals im Eis-Kochsalzgemisch 24 Stunden stehen liess, wodurch man dann das Serum bis auf Spuren von den Blutkörperchen entfernen konnte.

Jetzt hatte ich beim Auflösen eine verhältnissmässig reine und concentrirte O²Hb Lösung, welche viel rascher und besser krystallisirte und schon nach 24—48 Stunden sehr schöne und grosse Krystalle lieferte, die sich sehr bequem in der Centrifuge von Stromatafflocken rein waschen liessen.

Ausserdem war die Flüssigkeitsmenge eine um die Hälfte kleinere, wodurch eine Menge Alcohol gespart und die Arbeit erleichtert wurde.

Auf diese Art verarbeitete ich im Verlaufe von 4 Monaten das Blut von 5 Pferden, circa 40 Liter und gewann c. 2010 gramm krystallisirtes chemisch-reines O²Hb.

Um von vornherein allen Angriffen auf die chemische Reinheit des von mir dargestellten O²Hb entgegenzutreten und zugleich auch die Zinoffskyschen ¹¹⁾ Zahlen mit den Zahlen meiner Analysen vergleichen zu können, krystallisirte ich das O²Hb — wie es auch Zinoffsky gethan hatte, solange um, bis der Eisengehalt der Krystalle und der Mutterlauge constant blieb, nicht mehr als um 0.0001 pCt. differirte und weder mikroskopisch, noch spectroscopisch, weder Verunreinigungen, noch Zersetzungsproducte nachweisbar waren.

Dieses wurde nach viermaliger Umkrystallisation erreicht. Das vierte Mal wurden die Krystalle nicht mehr mit Hülfe von verdünnter Ammoniakflüssigkeit aufgelöst, sondern nur in destillirtem Wasser bei 10° C.; darauf wurde die Flüssigkeit mit $\frac{1}{5}$ Volumen 96 pCt. Alcohols versetzt und dann künstlicher Kälte ausgesetzt.

Die so erhaltenen Krystalle des Pferdeoxyhaemoglobins bildeten lange, schöne vierseitige Prismen. Andere Krystallformen habe ich bei der Darstellung nicht beachtet. Das Haemoglobin des Pferdeblutes bildet aber sehr schön ausgebildete sechsseitige Blättchen, wie ich in einem Falle beobachtete, wo ich aus einem Liter faulgewordenen Pferdeblutes O²Hb darzustellen versuchte. Die Krystalle waren aber bei gewöhnlicher Temperatur sehr leichtlöslich im Wasser und hatten eine dunklere, etwas ins Violette spielende Farbe, als das O²Hb.

Ferner zeigten die Pferdeblut-Oxyhaemoglobinkrystalle folgende Eigenschaften:

1. Die Krystalle lösten sich bei 1° C. 1:2000 in destillirtem Wasser, bei 10° C. 1:100, bei 15° C. dagegen schon 2:100. Auch in verdünntem kalten Alcohol, sowie in sehr verdünnten Alcalien und Alcalicarbonaten waren sie unzersetzt löslich. Ebenfalls löslich waren sie in Neutralsalzlösungen der Alcalien.

2. Auch in conc. H_2SO_4 waren sie scheinbar unzersetzt löslich, man bekam eine rothe Lösung und ein zweistreifiges Spectrum; es handelte sich aber hier in Wirklichkeit um Bildung von Haematoporphyrin.

3. Die Lösung in destillirtem Wasser hatte eine prachtvoll scharlachrothe Färbung und zeigte die beiden bekannten für O^2Hb charakteristischen Streifen im Spectrum zwischen den Fraunhofer'schen Linien D und E. --- Ebenfalls gab sie die Schönbeinsche Reaction mit Terpentinöl und Guajactinctur.

4. In Aether, Chloroform, Benzol und Schwefelkohlenstoff waren die O^2Hb Krystalle unlöslich. Beim längeren Liegen unter absolutem Alcohol wurden die Krystalle in Wasser unlöslich, ohne ihre Form und Farbe zu verlieren, indem wahrscheinlich eine Coagulation eintrat.

5. Reducirende Substanzen, wie $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ etc. führten das O^2Hb in neutraler oder schwach alcalischer Lösung in das dunklere Hb über.

6. Alle oxydirenden Mittel führten das O^2Hb zuerst in Methaemoglobin über.

7. Die Krystalle konnten nur bei 0° bis 1° C. auf porösen Thonplatten oder Cellulosetellern über H_2SO_4 unzersetzt getrocknet werden, wobei ich in einem Falle in den Exsiccator noch eine conc. alcalische Lösung von Pyrogallussäure brachte, um den beim Verdunsten des Wassers entstehenden Sauerstoff zu absorbiren. Die so getrockneten Krystalle waren von schön scharlachrother Farbe, blieben in Wasser völlig löslich und zeigten vor dem Spectroscope keine Zersetzungsproducte.

Doch dauerte die Trocknung zu lange und musste sorgfältig überwacht werden, damit die Temperatur nicht höher stieg als 1° C. Ueberhaupt konnte man nur kleine Mengen auf ein Mal trocknen.

In dünner Schicht auf flache Thonteller vertheilt und dann bei $+ 18-20^{\circ}$ C. getrocknet, wie Zinoffsky¹¹⁾ angiebt, konnte ich keine völlig unzersetzten und in Wasser löslichen Praeparate erhalten.

8. Die nach dieser Methode erhaltenen, trockenen Krystalle sind pleochromatisch und enthalten 10 pCt. Krystallwasser, welches bei 110° C. abgeben wird.

Qualitativ enthalten die Pferdeblut-Oxyhaemoglobinkrystalle Fe, S, N, O, H, C.

Beim Einäschern von 25 Gramm O^2Hb in einer Platinschale und Untersuchen der Asche wurden ausser Eisen auch nicht die minimalsten Spuren von Mg, K, Na, Ca oder sonstigen metallischen Substanzen gefunden.

Weitere 25 Gramm O^2Hb wurden auf Phosphor und Phosphorsäure geprüft. Es wurden weder nach der Mitscherlich'schen noch nach der Dusart-Bloudlotschen Methode (E. Schmidt pharm. Chemie 1887 pag. 302—303) weder qualitativ noch quantitativ Spuren von P. oder H_3PO_4 gefunden.

Wenn Zinoffsky¹¹⁾ meint Spuren von Ca, Mg und P. im Pferdeoxyhaemoglobin nachgewiesen zu haben, so müssen sie von irgendwo anders herrühren, das O^2Hb des Pferdeblutes enthält sie nicht.

Ebenfalls konnte ich in 10 Gramm meines O^2Hb -praeparates keine Spur Chlor nachweisen.

Nach jedesmaliger qualitativen Untersuchung führte ich von jedem Praeparate 4 quantitative Analysen aus.

Das Eisen wurde sowohl maassanalytisch als auch gewichtsanalytisch nach den von Fresenius¹²⁾ pag. 271—294 angegebenen Methoden bestimmt

Hier muss ich noch bemerken, dass ich sowohl hier, als auch bei meinen späteren Metall- O^2Hb -praeparaten die quantitativen Bestimmungen der einzelnen Bestandtheile möglichst nach mehreren Methoden ausgeführt habe, falls mehrere gleich genaue Methoden vorhanden waren, um besser mich selbst controlliren zu können. —

Zu Schwefelbestimmungen

wurden die Praeparate theils durch Schmelzen mit Aetzkali und Salpeter, wie es auch Zinoffsky¹¹⁾ gethan, theils durch Kochen mit einem Gemisch von einem Theil rauchender und 3 Theilen cone Salpetersäure zerstört und der Schwefel dann als Schwefelsäure mit Chlorbaryum bestimmt. Nach beiden Zerstörungsmethoden bekam ich gleiche und constante Resultate, nur war nach der Schmelzmethode viel unbequemer zu arbeiten.

Stickstoffbestimmungen

wurden sowohl nach der Kjeldahl'schen, Duma'schen wie auch Will-Varrentrapp'schen Methode ausgeführt. Bei sorgfältigster Arbeit gaben alle übereinstimmende Resultate.

Die C und H Bestimmungen

wurden wie gewöhnlich in einem schwerschmelzbaren Kaliglasverbrennungsrohr mit einem Gemisch von geschmolzenem Bleichromat, dem $\frac{1}{10}$ seines Gewichts geschmolzenes und gepulvertes Kaliumdichromat zugesetzt war, — ausgeführt (cfr. Beilstein¹²⁾ I. pag. 6), Sauerstoff wurde aus der Differenz bestimmt.

Zu jeder Analyse wurden c. 10 Gramm bei 115° C. bis zum constanten Gewicht getrockneten O²Hb verwendet. Ich führe nachstehend für jedes Praeparat nur die Mittelwerthe aus 4 Analysen an, wobei ich jedoch angebe, wie viel die grösste Differenz zwischen den einzelnen Analysen betrug:

O ² Hb Praepa- rate.	C %	H %	N %	O %	S %	Fe %	Grösste Differenz zwischen d. einzelnen Analysen.
I.	54.5011	7.2912	17.5120	19.8531	0.4493	0.3933	0.0015%
II.	54.5003	7.2899	17.5112	19.8569	0.4481	0.3936	0.00148 »
III.	54.5021	7.2904	17.5213	19.8369	0.4489	0.3931	0.002 »
IV.	54.4991	7.2931	17.5101	19.9551	0.4494	0.3932	0.0013 »
Mittel aus 16 Ana- lysen.	54.5006	7.2911	17.5136	19.8525	0.4489	0.3933	—

Aus den angeführten Analysen geht hervor, dass die Behauptung Bohrs ¹⁷⁾ im Scandinawischen Archiv für Physiologie: «Das krystallisirte Hb hat eine wechselnde Zusammensetzung selbst bei einer und derselben Thierart», nicht richtig ist.

Vielmehr beweisen die Analysen, dass im gesunden Blute einer Thierart nur eine O²Hb-art existirt. Bohr kann zu seiner Behauptung nur auf Grund der von ihm an nicht chemisch-reinen Praeparaten ausgeführten Analysen gelangt sein.

Vergleichende Tabelle

der procentischen Zusammensetzung des krystallisirten Pferdeblut-Oxyhaemoglobins nach den Analysen verschiedener Autoren.

Namen der Autoren	C in %	H in %	N in %	O in %	S in %	Fe in %
Hoppe Seyler und Kossel ¹⁸⁾	54.87	6.97	17.31	19.73	0.65	0.47
Otto ¹⁹⁾	54.76	7.03	17.28	19.81	0.67	0.45
Bücheler ¹⁶⁾	54.40	7.20	17.61	19.67	0.66	0.47
Zinoffsky ¹⁷⁾	51.15	6.76	17.94	23.43	0.39	0.34
Jutt, das Mittel aus 16 Analysen. . . .	54.5006	7.2911	17.5136	19.8525	0.4489	0.3933

Aus der vorstehenden Tabelle ist ersichtlich, dass meine Zahlen mit den Angaben Zinoffsky's merkwürdigerweise am wenigsten übereinstimmen. Mit den Analysen anderer Autoren stimmen sie im C-, H-, N-, O-gehalt lediglich, wenigstens die ganzen Zahlen, weichen aber im Fe- und S-gehalt bedeutend ab. Diese Erscheinung veranlasste mich, ausser den angeführten Analysen noch eine Anzahl Fe-, S- und N-bestimmungen bei jedem Praeparate vorzunehmen. Aber wie ich mich auch abmühte, oder nach welcher Methode ich auch arbeitete, um meine Zahlen mit denen der Anderen zur Uebereinstimmung zu bringen, es half nichts, die Zahlen blieben constant; nie fand ich den S — Fe — und Stickstoffgehalt niedriger als:

0.4481 pCt. S; 0.3932 pCt. Fe; 17.5101 pCt. N, aber auch nie höher als:

0.4495 pCt. S; 0.3937 pCt. Fe; 17.5214 pCt. N.

Die kleinen Differenzen können wohl als Versuchsfehler betrachtet werden. Da aber neben dem Spectrum gerade das Constantbleiben des Schwefel- und Eisengehaltes das beste Kriterium für die chemische Reinheit des O²Hb ist, so habe ich wohl keine Ursache weder an der Reinheit meiner Praeparate, noch an der Genauigkeit meiner Analysen zu zweifeln.

Aus den Mittelzahlen meiner Analysen berechnet sich folgende empirische Formel für Pferdeblut-Oxyhaemoglobin: $C_{648}H_{1040}N_{178}S_7FeO_{177}$, und aus dieser Formel das Molekulargewicht 14260.

Ob diese empirische Formel eventuell noch zu vervielfältigen ist, um das O²Hb-Molekül zu erhalten hoffe ich bei den folgenden Untersuchungen der Metall-O²Hb-ine ermitteln zu können.

IV.

Darstellung, Eigenschaften und Zusammensetzung der chemisch-reinen Metall-Oxyhaemoglobin-Verbindungen.

Nachdem ich in den Voruntersuchungen festgestellt hatte, mit welchen Schwermetallen das O²Hb überhaupt Verbindungen eingeht, musste ich versuchen, diese Verbindungen chemisch-rein darzustellen, um sie dann näherer chemischen Untersuchung unterwerfen zu können. Und zwar beschloss ich fürs erste nur die Metall-Oxyhaemoglobin-Verbindungen der uns im practischen Leben am häufigsten begegnenden Schwermetalle darzustellen, während ich das seltenere Wo und Mo unberücksichtigt liess.

Um auch diesen Einwendungen begegnen zu können, dass ich vielleicht zur Darstellung meiner Praeparate beim Trocknen eventuell verändertes O²Hb benutzt habe, oder dass bei der Darstellung Zersetzungen hätten eintreten können, habe ich alle meine Versuche mit feuchtem, frischem O²Hb ausgeführt und

das O²Hb gleich nach der Darstellung zu Praeparaten verarbeitet, um zugleich später bei den Analysen zu erfahren, ob die Praeparate zu verschiedenen Zeiten und aus dem O²Hb verschiedener Pferde dargestellt, immer constante Zusammensetzung zeigen. Nur zu einigen kleineren Nebenversuchen wurde frisches, feuchtes O²Hb in kleinen vollgefüllten, gut verkorkten Gläsern einige Tage, — in keinem Falle aber über eine Woche, in Eis eingefroren aufbewahrt. Vor jedesmaliger Benutzung wurden die Krystalle in destillirtem Wasser aufgelöst und spectroscopisch untersucht, nie wurde aber auch eine Spur von Zersetzungsproducten gefunden. Ebenso wurde bei der Darstellung der Praeparate jede Operation mit starkwirkenden Agentien vermieden, welche Zersetzungen hätten verursachen können.

Bevor ich zur Darstellung der Praeparate ging, stellte ich titrimetrisch fest, wie viel von dem betreffenden Metall zur Fällung des O²Hb unumgänglich nöthig ist, um nicht unnütz überschüssige Metallsalzlösung hinzuzufügen, welche dann später schwer vollständig zu entfernen ist. — Ich fand, dass zur vollständigen Fällung des O²Hb in wässriger Lösung bei Gegenwart irgend eines Alkali-Neutralsalzes genüigten:

2.336 %	metallisches	Zn	
2.256 »	»	Cu	
2.134 »	»	Ni	
2.143 »	»	Co	
2.007 »	»	Fe (oxydsalz)	
1.985 »	»	Cr	»
1.996 »	»	Mn	»
4.004 »	»	Cd	
3.755 »	»	Ag	
4.012 »	»	Su	
6.698 »	»	Pt	
6.669 »	»	Hg	
6.851 »	»	Pb	
7.004 »	»	Bi	
7.873 »	»	Ur.	

Da die Metall-Oxyhaemoglobin-Lösungen bei gewöhnlicher Temperatur in frischem Zustande in destillirtem Wasser löslich

sind, so entsteht beim Zusatz von berechneter Menge irgend eines Metallsalzes zur O^2Hb -Lösung kein Niederschlag, weshalb man die Lösung zur Gewinnung der Verbindung der künstlichen Kälte aussetzen muss, oder man setzt der Lösung etwas $NaCl$, $NaNO^3$, $MgSO_4$, Na_2SO_4 oder je nachdem mit welchem Metalle man arbeitet sonst eines passenden Neutralsalzes hinzu, wobei dann sofort die Metalloxyhaemoglobine sich auszuschcheiden beginnen, weil sie selbst in sehr verdünnten Alkalineutralsalzlösungen sehr schwerlöslich sind.

Auf beide Art, sowohl durch «Ausfrieren» als auch durch «Aus salzen» kann man chemisch-reine Praeparate erhalten, nur muss man im letzteren Falle ziemlich lange und anhaltend waschen und dialysiren, bis man die letzten Spuren des zum Aussalzen gebrauchten Salzes von dem Praeparate wieder völlig entfernt hat.

Da das Auswaschen in der Kälte sehr langsam geht, bei gewöhnlicher Temperatur aber das Praeparat durch langes Auswaschen seine schöne Farbe verliert und in Wasser schwerlöslich wird, so habe ich zu meinen Untersuchungen die Praeparate meist durch «Ausfrieren» dargestellt.

Ich versetzte, wie gesagt, eine Oxyhaemoglobinlösung von bekanntem pCt. Gehalt mit berechneter Menge Metallsalzlösung, schüttelte scharf durch und setzte der künstlichen Kälte aus. Nach dem Gefrieren liess ich die Lösung wieder langsam aufthauen, wo bei $0^\circ C.$ das Metalloxyhaemoglobin als meist un- deutlich krystallinisches Pulver sich am Boden absetzte und dann von der oben abgestandenen, wasserhellen Flüssigkeit in der Centrifuge rasch vollständig befreit werden konnte.

Die wasserhelle Flüssigkeit reagirte schwach sauer und man konnte in ihr durch Methylorange Spuren freier Säure nachweisen.

Da die zur Fällung gebrauchten Metallsalzlösungen stets gegen Methylorange neutral reagirten und die O^2Hb Lösung auch nicht sauer reagirte, so war es klar, dass beim Verbinden des Metalls mit dem O^2Hb die Säure sich gebildet haben musste. Der Niederschlag wurde jetzt mit eiskaltem Wasser geschüttelt und nochmals zum Gefrieren hingestellt.

Diese Operation wurde solange wiederholt, bis die gleich nach dem Aufthauen oben abgestandene, wasserhelle Flüssigkeit

nach dem Centrifugiren bei niedriger Temperatur vollständig reactionslos blieb und beim Verdunsten keinen Rückstand hinterliess. Zur Controlle wurde der Niederschlag noch der Dialyse auf 24 Stunden unterworfen. — Darnach wurde die Lösung aus dem Dialysator wieder zum Ausfrieren gestellt, nach dem Aufthauen der Niederschlag rasch in der Centrifuge vom Wasser befreit, auf poröse Thonplatten gebracht und bei $1-2^{\circ}\text{C}$. über H_2SO_4 im Exsiccator getrocknet.

Dargestellt wurden auf diese Weiso:

Zn	—	O^2Hb
Cu	—	O^2Hb
Ag	—	O^2Hb
Cd	—	O^2Hb
Hg	—	O^2Hb
Ur	—	O^2Hb
Ni	—	O^2Hb
Co	—	O^2Hb
Fe	—	O^2Hb
Cr	—	O^2Hb
Mn	—	O^2Hb
Sn	—	O^2Hb
Pb	—	O^2Hb
Pt	—	O^2Hb
Bi	—	O^2Hb

Alle diese Praeparate sind sowohl in physikalischer als auch in chemischer Hinsicht dem O^2Hb sehr ähnlich, nur sind sie in jeder Beziehung viel resistenter als letzteres und taugen nicht daher mehr zur Uebertragung von O an die Zellen:

$\text{Zn}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Ni}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Co}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Cd}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Hg}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Ur}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Cr}-\text{O}^2\text{Hb}$ sind sowohl in Substanz als auch in der Lösung fast ebenso schön scharlachroth gefärbt, wie das O^2Hb selbst; $\text{Mn}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Fe}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Ag}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Pb}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Cu}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Bi}-\text{O}^2\text{Hb}$, $\text{Sn}-\text{O}^2\text{Hb}$ und $\text{Pt}-\text{O}^2\text{Hb}$ sind dagegen dunkler gefärbt.

Diese Verbindungen sind sowohl in feuchtem, frischem Zustande, wie auch nach der angegebenen Methode getrocknet in

destillirtem Wasser löslich, jedoch etwas schwerer als das O^2Hb . So löst sich das $Fe - O^2Hb$ bei $15^\circ C.$ nur 0.35 pCt., das $Ag - O^2Hb$ 0.09 pCt.

Ebenfalls sind diese Verbindungen in verdünntem Alcohol schwerer löslich als das O^2Hb .

Leichtlöslich sind sie in sehr verdünnten Alcalien, freien Basen und Schwefelammon, etwas schwerer löslich in verdünnten organischen Salzlösungen des Ammoniak.

Sehr verdünnte Mineralsäuren, mit Ausnahme der stark oxydirenden, sowie sehr verdünnte organische Säuren lösen sie gleichfalls anfangs unzersetzt auf, erst nach längerer Zeit tritt eine Zersetzung ein.

Aus den Lösungen in verdünnten Alcalien können sie durch vorsichtige Neutralisation der Lösungen wieder unzersetzt gefällt werden.

In allen diesen Lösungen zeigen sie ein deutliches O^2Hb -Spectrum.

Concentrirte H_2SO_4 löst diese Verbindungen ebenso wie das O^2Hb unter Haematoporphyrinbildung auf.

Von conc. Alkalien und Säuren werden die Metalloxyhaemoglobin-Verbindungen alle mehr oder weniger leicht zersetzt.

Die wässrigen Lösungen dieser Verbindungen können, wenn man sie mit einem Reagensglase in kaltes Wasser stellt und das Wasser dann allmählig erwärmt, bis auf $100^\circ C.$ erhitzt werden, ohne dass sie sich zersetzen.

In selbst sehr verdünnten Neutralsalzlösungen der Alcalien und alcalischen Erden sind sie sehr schwerlöslich.

Die wässrigen Lösungen der Metalloxyhaemoglobine geben mit Terpentinoccl und Guajactinctur ebenso die Schönbein'sche Reaction, Blaufärbung, wie das O^2Hb . – Wir sehen daraus, dass durch die Bindung des O^2Hb an Metall die sauerstoffübertragende Kraft des O^2Hb nicht ganz aufgehört hat, denn sonst könnte diese Reaction nicht positiv ausfallen. Jedoch ist diese Eigenschaft des O^2Hb in den Metallverbindungen so herabgesetzt, dass sie im Organismus nicht mehr zur Geltung kommt.

Reducirende Mittel wirken auf Metalloxyhaemoglobine viel weniger ein, als auf das O^2Hb . So reducirt Schwefelammonium

die wässrigen Lösungen derselben erst beim längeren Stehen in verkorkter Flasche in der Wärme, beim Schütteln der Lösung mit Luft tritt wieder O^2Hb -Spectrum auf. Die Lösungen ohne Schwefelammoniumzusatz bleiben selbst wochenlang unverändert und zeigen das O^2Hb -Spectrum. — Auch diese Reaction beweist, dass die sauerstoffübertragende Kraft sehr verringert ist.

Beim Liegen unter starkem Alcohol werden die Praeparate unlöslich in Wasser, ebenso wie das O^2Hb .

In Aether, Chloroform und Schwefelkohlenstoff sind sie gleichfalls unlöslich.

Gegen oxydirende Mittel sind sie gleichfalls resistenter, als das O^2Hb . Die Metalloxyhaemoglobine lassen sich ebenso wie das O^2Hb in Cyanhaemoglobin, Haemochromogen, Haematoporphyrin etc. überführen, obgleich die Verwandlungen etwas langsamer vor sich gehen, als beim O^2Hb .

Nach dem Trocknen bei gewöhnlicher Temperatur werden die Metalloxyhaemoglobine ebenso wie das O^2Hb in Wasser und verdünntem Alcohol schwerlöslich. Am leichtesten lösen sich noch $Pb-O^2Hb$, $Sn-O^2Hb$, $Ur-O^2Hb$ und $Cd-O^2Hb$ in destillirtem Wasser. Dagegen bleiben sie in verdünnten Alcalien, Schwefelammonium etc. mit schönrother Farbe und O^2Hb -Spectrum löslich.

Auch die quantitative Zusammensetzung und die übrigen Eigenschaften bleiben unverändert.

Die Metalloxyhaemoglobine in gut ausgebildeten Krystallen zu erhalten, gelang mir nicht, wahrscheinlich deshalb nicht, weil ich bei künstlicher Kälte arbeitend die Lösungen nicht genug langsam und genügend lange Zeit auf die Temperatur bringen konnte, wo die Krystalle sich hätten gut ausbilden können.

Doch ist es nach den Eigenschaften und nach einem Fall zu urtheilen, wo ich eine kleine Menge $Hg-O^2Hb$ und $Ur-O^2Hb$ in ziemlich gut ausgebildeten, prismen ähnlichen Krystallen erhielt, welche aber beim Versuche, sie zu trocknen, undeutlich wurden, --- sehr wahrscheinlich, dass man auch die Metalloxyhaemoglobine nach irgend einer Methode wird in Krystallen erhalten können.

Nachdem ich eine genügende Menge von jedem Praeparate dargestellt hatte, unterwarf ich sie der qualitativen und quantitativen Analyse.

Qualitativ wurde jedes Mal ausser den Bestandtheilen des O^2Hb und des betreffenden Metalls nichts sonst nachgewiesen.

Zu quantitativen Analysen wurden die betreffenden Praeparate bei $115^\circ C.$ bis zum constanten Gewicht getrocknet, wobei alle genannten Praeparate durchschnittlich 10 pCt. Wasser abgaben.

Die quantitativen Bestimmungen wurden ebenso ausgeführt, wie bei O^2Hb angegeben. Die Trennungen und Bestimmungen der einzelnen Metalle wurden nach den von Fresenius¹²⁾, E. Schmidt¹³⁾ und Menschutkin¹³⁾ angegebenen und näher beschriebenen Methoden ausgeführt.

Zu Eisen-, Schwefel- und Metallbestimmungen wurden gewöhnlich c. 10 Gramm, zur Bestimmung der übrigen Bestandtheile c. 1 Gramm der betreffenden Praeparate verwendet.

Von jeder Metallverbindung wurden 4 Praeparate dargestellt und von jedem Praeparate 3 Analysen ausgeführt. Da aus den vollständigen Analysen der Silber- und Platinoxynhaemoglobine hervorging, dass das O^2Hb -Molekül nicht verändert wird, sondern dass das Metall nur dort hineintritt, ohne dass die Verhältnisse der Atome zu einander dadurch verändert werden, so wurden von den übrigen Praeparaten nur Schwefel-, Eisen-, Stickstoff- und Metallbestimmungen ausgeführt, weil man schon aus diesen zur Genüge constatiren konnte, ob auch bei den übrigen Praeparaten das O^2Hb -Molekül unverändert bleibt.

In der nachstehenden Tabelle führe ich die Resultate meiner Analysen an und zwar für jedes einzelne Metall-Oxyhaemoglobin-Praeparat das Mittel aus 3 Analysen mit der Angabe, wie viel die grösste Differenz zwischen den einzelnen Analysen gewesen ist.

Ag O ³ Hb	C %	H %	N %	O %	Ag %	S %	Fe %	Diffe- renzen.
I.	52.5583	6.9956	16.8435	19.1387	3.6558	0.4326	0.3785	0.0022
II.	52.5673	6.9857	16.9001	19.0863	3.6498	0.4317	0.3791	0.0031
III.	52.5591	6.9892	16.8511	19.1338	3.6564	0.4325	0.3779	0.0012
IV.	52.5569	6.9799	16.8492	19.1483	3.6546	0.4324	0.3787	0.0011
	52.5604	6.9861	16.8609	19.1277	3.6541	0.4323	0.3785	=Mittel aus 12 Analys.

Pt O ³ Hb					Pt %			Diffe- renzen.
I.	51.1175	6.7052	16.3818	18.6303	6.3896	0.4270	0.3681	0.0021
II.	51.1284	6.7101	16.3718	18.6039	6.3911	0.4268	0.3679	0.0014
III.	51.1025	6.7003	16.3800	18.6402	6.3799	0.4281	0.3690	0.00146
IV.	51.1095	6.7202	16.3901	18.6064	6.3777	0.4277	0.3684	0.00201
	51.1144	6.7089	16.3809	18.6654	6.3845	0.4270	0.3683	=Mittel aus 12 Analys.

Cu O ² Hb.	Fe %	S %	Cu %	N %	Differenzen.
I.	0.3844	0.4393	2.1694	17.1083	0.0021
II.	0.3850	0.4387	2.1701	17.1101	0.0016
III.	0.3845	0.4391	2.1688	17.1091	0.0020
IV.	0.3843	0.4390	2.1695	17.1121	0.0019
	0.3845	0.4390	2.1694	17.1099 =	Mittel aus 12 Analysen.
Zn O ² Hb.			Zn %		Differenzen.
I.	0.3792	0.4389	2.2298	17.0977	0.012
II.	0.3789	0.4391	2.2199	17.0898	0.0016
III.	0.3790	0.4388	2.2009	17.0901	0.0035
IV.	0.3794	0.4385	2.2197	17.0965	0.011
	0.3791	0.4388	2.2182	17.0935 =	Mittel aus 12 Analysen.
Cd O ² Hb.			Cd %		Differenzen.
I.	0.3778	0.4321	3.7812	16.8264	0.0031
II.	0.3780	0.4322	3.7800	16.8075	0.0025
III.	0.3776	0.4320	3.7790	16.8174	0.0026
IV.	0.3779	0.4322	3.7833	16.8270	0.0019
	0.3778	0.4321	3.7808	16.8195 =	Mittel aus 12 Analysen.

Hg O ² Hb.	Fe %	S %	Hg %	N %	Differenzen.
I.	0.3672	0.4196	6.5501	16.3409	0.0020
II.	0.3669	0.4188	6.5600	16.3501	0.0016
III.	0.3673	0.4195	6.5503	16.3428	0.0031
IV.	0.3670	0.4192	6.5511	16.3412	0.0018
	0.3671	0.4192	6.5523	16.3437	= Mittel aus 12 Analysen.
Pb O ² Hb.	Pb %				Differenzen.
I.	0.3664	0.4187	6.7923	16.3061	0.0011
II.	0.3666	0.4186	6.7888	16.3195	0.0018
III.	0.3670	0.4190	6.7919	16.3062	0.0022
IV.	0.3665	0.4188	6.7924	16.3009	0.0026
	0.3666	0.4187	6.7914	16.3081	= Mittel aus 12 Analysen.
Bi O ² Hb.	Bi %				Differenzen.
I.	0.3664	0.4121	6.8027	16.3035	0.003
II.	0.3659	0.4119	6.8116	16.3008	0.0027
III.	0.3667	0.4131	6.7999	16.3120	0.0013
IV.	0.3668	0.4122	6.8102	16.3029	0.0019
	0.3664	0.4123	6.8061	16.3048	= Mittel aus 12 Analysen.

Sn O ² Hb.	Fe %	S %	Sn %	N %	Differenzen.
I.	0.3709	0.4316	3.9596	16.8071	0.011
II.	0.3710	0.4309	3.9601	16.8102	0.0021
III.	0.3708	0.4314	3.9587	16.8081	0.0014
IV.	0.3706	0.4317	3.9595	16.7999	0.0023
	0.3708	0.4314	3.9594	16.8063	= Mittel aus 12 Analysen.
Cr O ² Hb.	Cr %				Differenzen.
I.	0.3868	0.4413	1.8066	17.1838	0.00165
II.	0.3869	0.4409	1.7998	17.1901	0.0027
III.	0.3866	0.4415	1.8071	17.1842	0.0019
IV.	0.3859	0.4412	1.8059	17.1798	0.0023
	0.3865	0.4412	1.8043	17.1844	= Mittel aus 12 Analysen.
Mn O ² Hb.	Mn %				Differenzen.
I.	0.3856	0.4476	1.8939	17.1625	0.0017
II.	0.3349	0.4480	1.8899	17.1710	0.0013
III.	0.3857	0.4475	1.8940	17.1619	0.0020
IV.	0.3854	0.4477	1.8877	17.1622	0.0021
	0.3854	0.4477	1.8913	17.1644	= Mittel aus 12 Analysen.

Fe O ² Hb.	Fe %	S %	N %	Differenzen.
I.	2.3132	0.4406	17.1566	0.0011
II.	2.3129	0.4410	17.1559	0.0014
III.	2.3133	0.4405	17.1567	0.0013
IV.	2.3134	0.4407	17.1570	0.0016
	2.3132	0.4407	17.1565	= Mittel aus 12 Analysen.

Co O ² Hb.			Co %	Differenzen.	
I.	0.3843	0.4400	2.0147	17.1353	0.023
II.	0.3850	0.4401	2.0098	17.1361	0.016
III.	0.3845	0.4410	2.0138	17.1342	0.003
IV.	0.3841	0.4402	2.0151	17.1299	0.0025
	0.3844	0.4403	2.0128	17.1338	= Mittel aus 12 Analysen.

Ni O ² Hb.			Ni %	Differenzen.	
I.	0.3839	0.4410	2.1033	17.1344	0.0311
II.	0.3837	0.4409	2.0998	17.1336	0.009
III.	0.3840	0.4407	2.1125	17.1343	0.0018
IV.	0.3838	0.4421	2.1204	17.1346	0.0021
	0.3838	0.4411	2.1090	17.1342	= Mittel aus 12 Analysen.

Ur O ² Hb.	Fe ‰	S ‰	Ur ‰	N ‰	Differenzen.
I.	0.3689	0.4143	7.7663	16.1300	0.015
II.	0.3690	0.4139	7.7750	16.1311	0.020
III.	0.3691	0.4142	7.7599	16.1211	0.002
IV.	0.3688	0.4144	7.7655	16.1401	0.0018
	0.3688	0.4142	7.7666	16.1305	Mittel aus 12 Analysen
Ag Zn O ² Hb.	Fe ‰	S ‰	Ag ‰	Zn ‰	N ‰
	0.3706	0.4235	3.5737	2.1508	16.4923

Aus den Analysen ist ersichtlich, dass die von mir dargestellten Metall-Oxyhaemoglobine eine recht constante Zusammensetzung zeigen, gleichgültig wann und aus welchem Pferde-Oxyhaemoglobin sie dargestellt waren, so dass an der chemischen Individualität dieser Verbindungen nicht mehr gezweifelt werden kann.

Mein Zn—O²Hb enthielt gerade zweimal soviel Zn (2.2 pCt.), als das von Grahe hergestellte (1.01 pCt. Zn), wovon das herührt, habe ich nicht ermitteln können, möglich ist ja immer, dass — wie wir später sehen werden — man vielleicht auch Praeparate mit mehr oder weniger Zn noch darstellen kann. Dagegen stimmt mein Cu—O²Hb mit dem von Klemptner dargestellten im Cu-Gehalt sehr gut überein. Klemptner fand 2.0 pCt. ich 2.1 pCt.

Nun war interessant zu wissen, zu welcher Gruppe von chemischen Körpern diese Verbindungen eigentlich hingehörten?

Berechnet man nämlich aus den Durchschnittszahlen der Analysen die empirischen Formeln für diese Verbindungen, so findet man, dass die Atomverhältnisse der einzelnen Elemente im

O²Hb-Molekül dieselben geblieben sind, nur sind 5 Atome des betreffenden Metalls hinzugekommen, gleichgültig, ob das Metall ein-, zwei-, drei- oder vierwerthig ist.

Daraus sieht man, dass das O²Hb kein säureartiger Körper sein kann, wie man es in den Lehrbüchern angegeben findet. Denn wäre das O²Hb als eine Säure aufzufassen, so müsste doch beim Eingehen von Verbindungen mit den Basen auch die Atomigkeit der Elemente in Betracht kommen, was hier aber durchaus nicht der Fall ist. Wenn man hier sieht, dass ein Molekül O²Hb 5 Atome eines vierwerthigen Elementes, wie Pt, bindet, so kann man schwerlich annehmen, dass das O²Hb hier als eine 20-basische Säure fungirt und die stärksten Mineralsäuren aus ihren Salzen freimacht!

Ausserdem sprechen die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Verbindungen gegen die bisherige Auffassung von Salzen.

Wenn diese Verbindungen Salze wären, so wäre doch höchst merkwürdig, dass sie sowohl in verdünnten Säuren, als auch in verdünnten Alcalien, Basen und Schwefelammonium unzersetzt löslich sind, und dass z. B. die Silberverbindung in Wasser aufgelöst nach Zusatz von verdünnter Salzsäure oder verdünnten Schwefelammoniums, wochenlang stehen kann, ohne dass auch nur eine Spur von AgCl oder Schwefelsilber zur Ausscheidung kommt. Erst ein grosser Ueberschuss von starker Säure resp. Schwefelammoniums bewirkt eine Zersetzung des Silber-Oxyhaemoglobins.

Ebenso wenig, wie Salze, sind diese Verbindungen Additionsproducte, denn sonst müsste man ja bei den Analysen dieser Verbindungen ausser dem Metall auch die betreffende Säure des zur Fällung benutzten Salzes gefunden haben, was aber nie der Fall gewesen ist.

Da diese Verbindungen weder Salze, noch Additionsproducte sind, so können sie nur Substitutionsproducte sein. Für diese Anschauung sprechen auch schon die Eigenschaften der Metall-Oxyhaemoglobine, welche denen der Muttersubstanz, des O²Hb sehr ähnlich sind, was ja bekanntlich nur bei den Substitutionsproducten der Fall ist.

Um zu entscheiden, ob es sich hier wirklich um eine Substitution handelt, probierte ich in das Oxyhaemoglobinmolekül z. B. zwei Metalle Zn und Ag zu gleicher Zeit einzuführen, was ja gelingen musste, wenn diese Verbindungen durch Substitution zu Stande kämen. Und es gelang mir auch wirklich ein Zn-Ag-O²Hb Präparat dadurch darzustellen, dass ich eine O²Hb-Lösung von bekanntem Gehalte mit einer Mischung von soviel Silbernitrat- und Zinknitratlösung versetzte, als nach der Berechnung von den beiden Metallen einzeln zur Fällung nöthig gewesen wäre.

Das Präparat war in seinen Eigenschaften den andern vollkommen ähnlich, nur war die Farbe etwas rötlicher als die des Ag-O²Hb und etwas dunkler als die des Zn-O²Hb. Es enthielt 3.5 pCt. Ag und 2.1 pCt. Zn.

Eine Silberverbindung mit 2 Mal soviel Silber im Molekül darzustellen, gelang mir vorläufig nicht, aber unmöglich wird es nicht sein.

War schon die Möglichkeit, eine Zn-Ag-O²Hb-Verbindung darzustellen, ein Beweis für die Substitution, so entstand jetzt die Frage, was denn eigentlich im O²Hb substituiert wird.

Da das Auftreten von Ammoniak oder dem Ammoniak ähnlichen Verbindungen bei der Darstellung der Metall-Oxyhaemoglobine nie beobachtet wurde, was ja der Fall gewesen wäre, wenn irgend ein Amidcomplex des O²Hb-Moleküls substituiert worden wäre, so musste ich annehmen, dass der Wasserstoff hier substituiert wird. Ebenso spricht das Constantbleiben des Stickstoffgehaltes dafür, dass kein N substituiert worden ist.

Zu Gunsten dieser Auffassung sprach ja auch das vorher beobachtete Auftreten von freier Säure bei der Darstellung der Metall-Oxyhaemoglobine, was dadurch zu Stande kommen musste, dass der substituierte Wasserstoff sich mit dem frei gewordenen Säureradical des Metallsalzes zur Säure vereinigte.

Da aus den quantitativen Analysen nicht mit Sicherheit nachzuweisen war, ob und wie viel Wasserstoffatome hier substituiert werden, so versuchte ich dieser Frage auf einem anderen Wege beizukommen, indem ich die Voraussetzung machte, dass wenn H substituiert wird, so müssen z. B. 2-atomige Elemente 2 Mal soviel H substituieren als einatomige und in Folge dessen müsste bei der

Darstellung des $\text{Zn-O}^2\text{Hb}$ z. B. zweimal soviel Säure sich bilden, als bei der Gewinnung des $\text{Ag-O}^2\text{Hb}$.

Um zu constatiren, ob das der Fall ist, bereitete ich mir nach der von F. Mylius und F. Foerster²⁰⁾ angegebenen Methode zuerst ein völlig neutrales Silbernitrat und ein ebensolches Zinknitrat und stellte mit diesen Salzen dann nach der vorherbeschriebenen Gefriermethode aus dem O^2Hb die Metallverbindungen dar. Wie gesagt, liess sich in der nach dem Centrifugiren wasserhell gewordenen Flüssigkeit auch hier mit Methylorange das Auftreten von freier Säure constatiren. Diese Flüssigkeiten wurden daher aufgehoben, und nach der von F. Mylius und F. Foerster²⁰⁾ angegebenen Eosinaetherschüttelmethode mit $\frac{1}{1000}$ Normalnatronlauge titirt, wobei sich herausstellte, dass beim Darstellen von $\text{Zn-O}^2\text{Hb}$ wirklich zweimal soviel freie Säure auftritt, als beim Darstellen von $\text{Ag-O}^2\text{Hb}$.

Damit hoffe ich den Beweis geliefert zu haben, dass es sich hier wirklich um Substitution des Wasserstoffs handelt.

Die Atomigkeiten der betreffenden Elemente in Betracht ziehend lassen sich aus den Mittelwerthen der angeführten Analysen für meine Metall-Oxyhaemoglobine folgende empirische Formel und Molekulargewichte berechnen:

- I. $\text{Ag-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1035} \text{N}_{178} \text{Ag}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 14795.$
- II. $\text{Pt-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1020} \text{N}_{178} \text{Pt}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 15212.$
- III. $\text{Cu-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1030} \text{N}_{178} \text{Cu}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 14566.$
- IV. $\text{Zn-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1030} \text{N}_{178} \text{Zn}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 14575.$
- V. $\text{Cd-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1030} \text{N}_{178} \text{Cd}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 14810.$
- VI. $\text{Hg-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1030} \text{N}_{178} \text{Hg}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 15250.$
- VII. $\text{Pb-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1030} \text{N}_{178} \text{Pb}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 15282.$
- VIII. $\text{Bi-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1025} \text{N}_{178} \text{Bi}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 15285.$
- IX. $\text{Sn-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1030} \text{N}_{178} \text{Sn}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 14827.$
- X. $\text{Cr-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1020} \text{N}_{178} \text{Cr}_6 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 14502.$
- XI. $\text{Mn-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1020} \text{N}_{178} \text{Mn}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 14520.$
- XII. $\text{Fe-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1025} \text{N}_{178} \text{Fe}_6 \text{S}_2 \text{O}_{177} = 14525.$
- XIII. $\text{Co-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1030} \text{N}_{178} \text{Co}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 14543.$
- XIV. $\text{Ni-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1030} \text{N}_{178} \text{Ni}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 14543.$
- XV. $\text{Ur-O}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1030} \text{N}_{178} \text{Ur}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 15450.$
- XVI. $\text{AgZnO}^2\text{Hb} = \text{C}_{648} \text{H}_{1025} \text{N}_{178} \text{Ag}_5 \text{Zn}_5 \text{S}_2 \text{Fe O}_{177} = 15110.$

Wie die aus den quantitativen Analysen der Metall-Oxyhaemoglobine berechneten Formeln beweisen, ist die vorher angegebene Formel für O^2Hb : $C_{618} H_{1040} N_{178} S_4 Fe O_{177}$ nicht mehr nöthig zu vergrössern.

Vergleichende Tabelle

der bei den Analysen gefundenen und aus den empirischen Formeln der Metall-Oxyhaemoglobine berechneten Metallmengen, die von O^2Hb gebunden worden sind.

Präparato.	Metall gefunden in %.	Metall berechnet in %.
Ag O^2Hb	3.654	3.665
Pt O^2Hb	6.384	6.390
Cu O^2Hb	2.169	2.191
Zn O^2Hb	2.218	2.228
Cd O^2Hb	3.780	3.790
Hg O^2Hb	6.552	6.554
Pb O^2Hb	6.791	6.794
Bi O^2Hb	6.606	6.800
Sn O^2Hb	3.959	3.960
Cr O^2Hb	1.801	1.800
Mn O^2Hb	1.891	1.889
Fe O^2Hb	1.920	1.909
Co O^2Hb	2.012	2.015
Ni O^2Hb	2.109	2.009
Ur O^2Hb	7.766	7.770

Da die gefundenen und berechneten Metallmengen im Ganzen gut mit einander übereinstimmen, so ist wohl auch anzunehmen, dass die Formeln für diese Verbindungen nicht allzu grosse Fehler einschliessen können.

Nachdem ich die Darstellung meiner Praeparate schon beendet hatte und zu den analytischen Versuchen übergegangen war, erschien von Max Siegfried²¹⁾ eine Arbeit über ein neues organisches Eisenpraeparat — Carniferrin — über welches ich hier noch anhangsweise einige Worte sagen möchte, weil dasselbe zu einem Vergleiche mit dem von mir dargestellten Eisen-Oxyhaemoglobin herausfordert.

Concentrirte Lösungen beider Substanzen in verdünnten Alcalien sehen sich nämlich einander sehr ähnlich, beide enthalten das Eisen ferner in einer für gewöhnliche Reagentien nicht sogleich zugänglicher Form, das Carniferrin jedoch viel lockerer gebunden, als das Eisenoxyhaemoglobin, und beide dürften zu therapeutischen Zwecken in Frage kommen. Das vom Autor freundlichst Professor Kobert übersandte Praeparat war ein gelblich rothbraunes, fast geruch- und geschmackloses Pulver, welches in Wasser unlöslich war und 25.2 pCt. Fe enthielt, während vom Autor ein Eisengehalt über 35 pCt. und noch mehr angegeben wird.

In verdünnten Alcalien war das Praeparat mit rother Farbe löslich, jedoch schwerer als mein $\text{Fe-O}^2\text{Hb}$. Die verdünnte Lösung des Carniferrins ist dagegen gelb orange, während das $\text{Fe-O}^2\text{Hb}$ auch in verdünnter Lösung roth ist.

Verdünnte Lösungen des $\text{Fe-O}^2\text{Hb}$ bleiben wochenlang unverändert und zeigen O^2Hb -Spectrum, während alcalische Carniferrinlösung nur einen starken Absorptionsstreifen zwischen Grün und Violett zeigt und nach kurzer Zeit sich zersetzt, das Eisen fallen lässt und gallertig wird.

$\text{Fe-O}^2\text{Hb}$ löst sich in sehr verdünnten nicht zu stark oxydirenden Mineralsäuren leicht unzersetzt auf und zeigt ein O^2Hb -Spectrum, Carniferrin war selbst in ziemlich starken Mineralsäuren unlöslich, erst conc. Salpetersäure und Salzsäure lösten es mit gelber Farbe auf, die Lösung zeigte kein Spectrum mehr.

Conc. Schwefelsäure löst das $\text{Fe-O}^2\text{Hb}$ unter Haematoporphyrinbildung auf, das Carniferrin dagegen wird von derselben milchig trübe, zersetzt.

Sowohl das $\text{Fe-O}^2\text{Hb}$, als auch das Carniferrin geben mit Terpentinoel und Guajactinctur die Schönbein'sche Reaction: Blaufärbung. Da Siegfried sein Carniferrin aus dem Fleisch-

extract darstellt, so wäre es nicht undenkbar, dass diese Substanz, woran hier das Eisen gebunden ist, ein haematoidinartiger, in letzter Instanz aus dem in den Muskeln enthaltenen Farbstoffe stammender Körper sein könnte. Ueber diesen Muskelfarbstoff ist viel gestritten worden, ich will hier nicht weiter auf die Einzelheiten eingehen, glaube aber doch als sicher hinstellen zu können, dass der Muskelfarbstoff dem Blutfarbstoff sehr ähnlich ist resp. von ihm her stammt.

Nach den vorhergehenden Eigenschaften und Reactionen, so wie nach dem vom Autor selbst angegeben, sehr bedeutenden Schwankungen des Eisengehaltes zu urtheilen, scheint es mir noch nicht bewiesen zu sein, dass das Carniferrin eine einheitliche Substanz, ein wirkliches Salz ist, was ja doch der Fall sein müsste, wenn eine sogenannte Phosphorfleischsäure resp. Fleischsäure existirt.

Eben erschien eine Arbeit von Dr. W. S. Hall²⁴⁾ über die Resorbirbarkeit des Carniferrins. Der Autor giebt an, dass das Carniferrin «etwa 30 pCt. Fe» enthält und «leicht resorbirbar ist», obwohl «keine wesentliche Vermehrung der Ausscheidung des Eisens durch den Harn bei Darreichung von Carniferrin stattfindet».

Auch aus dieser Arbeit geht unter Anderem hervor, dass Carniferrin keine einheitliche Substanz sein kann, sonst wäre eine Schwankung von mehr als 10 pCt. im Eisengehalte nicht denkbar. Das käufliche, eben im Handel erschienene Carniferrin, von Meister, Lucius und Brüning im Höchst dargestellt, enthält 28.03 pCt. Fe und giebt bei 110° C. 7 pCt. Wasser ab.

V.

Schlussfolgerungen.

Die Hauptergebnisse meiner Arbeit in Kürze zusammenfassend, komme ich zu folgenden Schlüssen:

1. Die von Zeit zur Zeit in der Litteratur auftauchenden Meinungen, als ob die Krystalle des rothen Blutfarbstoffs keine einheitlichen Substanzen, keine chemischen Individuen wären, sondern dass die rothe Farbe der Krystalle nur aus einer mechanischen Beimengung herstamme, sind nicht begründet. Wenn

Struve in den Berliner chemischen Berichten²²⁾ diesen Schluss daraus ziehen zu können meint, dass er angiebt: «die durch absoluten Alcohol unlöslich gewordenen und unverändert gebliebenen O²Hb Krystalle lassen sich durch ammoniakhaltigen Alcohol entfärben, ohne dass die Krystalle ihre Form verlieren», so kann ich dieser Meinung nicht beipflichten, vielmehr beweist diese Erscheinung, dass die O²Hb Krystalle in absolutem Alcohol trotz scheinbarer Beibehaltung der Krystallform nicht unverändert geblieben sind, sondern dass eine Coagulation, eine Spaltung des O²Hb-Moleküls eingetreten ist und in Folge dessen der Farbstoff sich auch ohne weiteres aus der coagulirten Eiweissmasse extrahiren lässt, wobei die Krystalle scheinbar ihre frühere Form beibehalten können.

Aus den quantitativen und qualitativen Analysen der von mir dargestellten chemisch-reinen O²Hb-Praeparate geht mit Sicherheit hervor, dass das O²Hb ein vollständiges chemisches Individuum ist.

2. Sowohl Serum und Stromata — Eiweisstoffe, als auch das O²Hb gehen einzeln mit den verschiedensten Salzen und Doppelsalzen der meisten Schwermetalle Verbindungen ein, jedoch hat das O²Hb zu den Schwermetallen die grösste Energie, so dass im Blute besonders, wo einige Neutralsalze, wie Chlornatrium etc. vorhanden sind, in welchen die entstehenden Metallverbindungen sehr schwerlöslich sind, die Metalle sich zuerst mit dem O²Hb verbinden und nachdem Alles O²Hb gebunden, geht das Metall auch mit den übrigen Eiweisstoffen des Blutes Verbindungen ein.

Auf diese Beobachtungen basirend — habe ich im Vorstehenden eine Methode zum Titriten des Blutfarbstoffes angegeben und auch für einige Blutarten die nach dieser Methode bestimmten Haemoglobinzahlen vergleichend mit den von anderen Autoren, nach anderen Methoden gefundenen Zahlen angeführt.

Später, wenn die materiellen Verhältnisse es mir gestatten werden, hoffe ich diese Methode noch vervollständigen zu können, so dass man auf bequeme Art die Haemoglobinbestimmungen auch ohne die theuren und nicht immer zur Hand habenden Spectralapparate etc. rasch und sicher ausführen kann, wobei

man ausserdem noch den Nutzen hat, dass man seine Resultate zu jeder Zeit selbst controlliren kann, während mit den, die Farbenintensitäten vergleichenden Apparaten arbeitend, die Resultate nach den individuellen Schwankungen des Farbensinnes verschieden ausfallen können und der Arbeitende selbst dabei unsicher bleibt. Ich denke dass gerade darin die Ursache der ziemlich erheblichen Differenzen der von verschiedenen Autoren angegebenen Haemoglobinzahlen für eine und dieselbe Blutart zu suchen ist.

3. Die von mir dargestellten und chemisch untersuchten 16 Metall-Oxyhaemoglobine sind ebenso wie das Oxyhaemoglobin selbst chemische Individuen und zwar Substitutionsproducte des Oxyhaemoglobins, woher sie auch ihrer Muttersubstanz dem Oxyhaemoglobin in vielen Eigenschaften sehr ähnlich sind.

In wie fern diese Praeparate therapeutisch verwerthet werden können, müssen weitere Untersuchungen beweisen, doch ist es nicht unwahrscheinlich dass einige derselben, wie z. B. das Zink-, Eisen-, Kupfer-, Mangan-, Wismuth-, Blei- und Quecksilberpraeparat wohl medicinisch verwendet werden können, da sie, nach ihren Eigenschaften zu urtheilen, auf den Organismus nicht so reizend wirken dürften, wie die anorganischen Salze dieser Metalle.

4. Da wir gesehen haben, dass die Salze der Schwermetalle besonders auf den rothen Farbstoff der Blutkörperchen einwirken, indem sie mit dem Blutkörperchen zusammentreffend, in dasselbe hineindringen, mit dem Haemoglobin sich verbinden und das Blutkörperchen zum Quellen und schliesslich zum Zerfall bringen; und da eine ganze Anzahl der stärksten Gifte gerade in die Gruppe der Schwermetalle gehört, so drängten sich mir unwillkürlich die Fragen auf:

«Worauf möge wohl die hauptsächlichste Giftwirkung dieser Metalle beruhen und wovon hängt es ab, das einige Metalle stärker, andere weniger giftig wirken?»

Ueber diese Fragen nachdenkend und die Entstehungsbedingungen und Eigenschaften meiner Metall-Oxyhaemoglobine in Betracht ziehend, bin ich zur folgenden Anschauung gelangt:

«Die stärkere oder schwächere Giftwirkung der Schwermetallsalze ist erstens direct proportional der leichteren oder

schwereren Resorbirbarkeit derselben; sie hängt ferner davon ab, ob die nach der Resorption des Metallsalzes im Blute entstehenden Metall Oxyhaemoglobine von den im Blute vorhandenen Neutralsalzen — Chlornatrium etc. leichter oder schwerer, grob oder feinflockig gefällt werden».

Die hauptsächlichste Giftwirkung der Schwermetallsalze kommt aber — wenn wir bei innerlicher Darreichung die irritirenden Wirkungen im Magendarmkanal ausser Acht lassen — dadurch zu Stande, dass diese Metalle, nachdem sie durch Resorption ihrer Salze oder sonst wie ins Blut gelangt sind, sich mit dem Blutfarbstoffe verbinden und denselben zu seiner normalen Function — zur Uebertragung und Vermittelung des Sauerstoffs an die Zellen — untauglich machen, wodurch dann die Verbrennung und Energieentwicklung im Körper eine mangelhafte wird, so dass dadurch im ganzen Maschieneriebetriebe des lebendigen Organismus — ähnlich wie bei einer Dampfmaschine bei mangelhafter Dampfentwicklung — Verlangsamungen und Stockungen hervorgerufen werden, wovon die grosse Schwäche, die Abnahme und Unregelmässigkeiten der Herzschläge, die Athemnoth, das Auftreten von Empfindungslosigkeit und Lähmungen — ohne dass die Nerven und Muskeln in ihrer Reizbarkeit sonst erheblich alterirt wären²³⁾, bei Metallvergiftungen zeugen.

Ausserdem sind die neuentstandenen Metallverbindungen in den Salzlösungen des Blutes schwerlöslich und scheiden sich daher allmählig im Blute als mehr oder weniger feine Flocken aus, welche fürs erste im Blute suspendirt bleiben und vom Blutstrome weitergetragen werden.

Die grösseren Blutgefässe passiren die im Blute herum schwimmenden Flocken ungehindert, sobald sie aber mit dem Blutstrome in die feinsten peripheren Capillare und in die Capillare solcher Organe gelangen, wo das Blut sehr langsam fliesst — Leber — Milz — Niere —, bleiben sie darin theilweise stecken, verhindern den regelmässigen, freien Kreislauf des Blutes, oder verstopfen sogar die Capillaren, wodurch dann Reizungen dieser Organe, Ernährungsstörungen und auch Absterben der von diesen Capillaren versorgten Zellen eintreten kann. Auf diese Ursachen

sind wohl auch die ungemeine Blässe und Kälte der Haut, sowie das Herausfallen und Lockerwerden der Haare und Zähne bei schweren Metallvergiftungen zurückzuführen.

Da in der Leber Milz und Niere der Blutstrom ein langsamer ist, so werden in den Capillaren dieser Organe am meisten von den — als Fremdkörper im Blute herumschwimmenden Flocken stecken bleiben. Dadurch wird der Kreislauf des Blutes in diesen Organen — aber erheblich gestört, wodurch die Reizungen, Blutüberfüllungen und Degenerationen dieser Organe bei Metallvergiftungen erklärt werden können.

Tritt kein Tod ein, so versucht der Organismus allmählich sich von den Fremdkörpern zu befreien, indem er die steckengebliebenen Metallverbindungen des Blutfarbstoffs theils reducirt und dann in andere Verbindungen überführt, so dass sie dann durch Schweiss, Speichel und Harn abgegeben werden können, theils werden diese Flocken durch die Gefässwände hindurch gepresst und gelangen dann durch den Darm etc. zur Ausscheidung, wodurch dann auch die regelmässig beobachtete Hyperämie und Schwellung der Darmschleimhaut, auch wenn das Gift subcutan applicirt wurde — bei Metallvergiftungen erklärbar wird. Ein Beweis dafür, dass diese Anschauung über das Zustande kommen der Metallvergiftungen nicht allzuweit von der Wahrheit abirrt, dürfte auch darin zu finden sein, dass nach dieser Theorie ausser den vorhergenannten Thatsachen auch noch verschiedene andere, von Meyer und Williams²³⁾ von Mering²³⁾ und Schlesinger²³⁾ bei Metallvergiftungen beobachteten Erscheinungen, wie dunkle Farbe des Blutes, hochgradige Verminderung der Kohlensäuremenge im Blute etc., für welche die genannten Autoren keine genügende Erklärung zu finden vermochten, ohne Zwang erklärt werden können.

So schreiben z. B. Meyer und Williams²³⁾ bei der Untersuchung über acute Eisenvergiftung:

«Es lag der Gedanke nahe, dass die dunkle Blutfarbe durch Kohlensäureanhäufung bedingt sei, indem die Versuchsthiere bei zunehmender Lähmung der Gefässe nicht mehr genügend zu respiriren im Stande sind. — Indess ergaben die in dieser Richtung angestellten Blutgasanalysen der entsprechend vergifteten

Thiere, ein geradezu entgegengesetztes Resultat. Wir fanden stets bei hochgradiger Vergiftung die Sauerstoffmenge normal, die Menge der Kohlensäure aber ganz erheblich herabgesetzt.»

Um diese Thatsachen zu erklären, schreiben die genannten Autoren weiter: «Zur Erklärung einer so hochgradigen Verminderung der Kohlensäure im Blute wird man zunächst an eine theilweise Neutralisation der Blutalcalien zu denken haben, wenngleich das Blut stets seine normale alcalische Reaction bewahrte.»

Dass eine solche Erklärung eigentlich keine Erklärung ist, darüber braucht man nicht lange nachzudenken. Denn, wenn «das Blut stets seine normale alcalische Reaction bewahrte,» wie könnte dann eine theilweise Neutralisation der Blutalcalien stattgefunden haben?

Da nun aus meinen vorhergehenden Untersuchungen bekannt ist, dass das Eisen und andere Schwermetalle mit dem Blutfarbstoffe Verbindungen eingehen und dass diese Verbindungen im Ganzen eine dunklere Farbe haben, wie der Blutfarbstoff selbst, so ist damit die Erklärung für die dunkle Farbe des Blutes bei Eisenvergiftung gegeben.

Ebenso ist es aus dem Vorhergehenden bekannt, dass die Verbindungen des Blutfarbstoffes mit Metallen nicht mehr fähig sind den Sauerstoff, ähnlich dem Blutfarbstoff, an die Zellen des Organismus zu übertragen. Weil nun aber bei jeder Metallvergiftung durch das in Blut gelangte Metall ein Theil des Blutfarbstoffes von dem Metall gebunden und dadurch die Menge des sauerstoffübertragenden Blutfarbstoffes vermindert wird, so geht bei einer solchen Vergiftung auch die Verbrennung im Körper in einem geringeren Grade vor sich und die Folge davon ist, dass im Organismus viel weniger Kohlensäure producirt und an das Blut abgegeben wird, als im normalen Zustande.

Da aber beim Athmen immer gleichviel Sauerstoff mit der Luft aufgenommen wird und ebenso wie gewöhnlich Kohlensäure beim Ausathmen abgegeben wird, so muss ja die Kohlensäuremenge sich im Blute verringern, während die Sauerstoffmenge normal bleibt.

Ich hoffe nicht, dass diese Erklärung eine weniger annehmbare ist, als die von Hans Meyer und Francis Williams gegebene.

Litteraturverzeichniss.

1. **Prof. Alex. Schmidt:** Über Menschenblut und Froschblut. Pag. 13. 1881. Dorpat u. Fellen.
2. **Morohowetz:** Einheit der Proteinstoffe. Band I. Pag. 695; daselbst siehe auch die ausführlichen Litteraturangaben über die Arbeiten der genannten Autore. Pag. 695—723.
3. **Prof. R. Kobert:** I. Über ein neues Parhaemoglobin. Sitzungsberichte der Dorpater Naturforschergesellschaft. 1891.
II. Über den Nachweis von Fermenten und Giften im Blute. Vortrag, gehalten in der Section für Pharmacie und Pharmacognosie der 64. Versammlung der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte zu Halle an der Seine im September 1891; abgedruckt in den Verhandlungen dieser Versammlung. Pag. 177.
III. Über resorbirbare Eisenpraeparate. Vortrag, gehalten in der wissenschaftlichen Sitzung der medicinischen Facultät zu Dorpat am 15. Nov. 1891. Separatabdruck aus der St. Peterburger medic. Wochenschrift Nr. 49, 1891.
4. **Emil Grahe:** Über die Einwirkung des Zinnes und seiner Salze auf das Blut und den Blutfarbstoff. Separatabdruck aus den Arbeiten des pharmakolog. Inst. zu Dorpat. IX. 1893.
5. **Max Klemptner:** Zur Wirkung des Kupfers auf den thierischen Organismus. Dissertation. Jurjew, 1894.
6. **G. Semmer:** Über Faserstoffbildung bei Amphibien- u. Vogelblut. Dissertation. Dorpat, 1874.
7. **Prof. Alex. Schmidt:** Zur Blutlehre. Leipzig, 1892. Pag. 19.
8. **E. Harnack:** Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmacologie. Band IX. 1878. Pag. 152.
9. **J. Georgenburger:** Zur Kenntniss des Blutfarbstoffes und seiner Derivate. Dissertation. Jurjew, 1894.

10. **Citirt nach Landois:** Lehrbuch der Physiologie des Menschen. Leipzig, 1891.
11. **O Zinoffsky:** Über die Grösse des Haemoglobinmoleküls. Dissertation. Dorpat, 1885.
12. **Fresenius:** Anleitung zur quantitativen Analyse. Band I. u. II. 1875–87.
13. **Beilstein:** Handbuch der organischen Chemie. Band I. 1886.
14. **Zeitschrift für physiologische Chemie** Band II. Pag. 149.
15. **Zeitschrift für physiologische Chemie.** Band VII. Pag. 61.
16. **Hüfner:** Gratulationsschrift an C. Ludwig. 1886.
17. **Du Bois-Reymond's Archiv für Physiologie.** 1894. Pag. 130 etc.
18. **Ernst Schmidt:** Ausführliches Lehrbuch der pharmaceutischen Chemie. I. 1837.
19. **N. Menshutkin:** Analytische Chemie 1893.
20. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.** Band 24. I. 1891. Pag. 1482–1498.
21. **Max Siegfried:** Über Fleischsäure. Separatabdruck aus Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiologische Abtheilung, 1894.
22. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.** Band XVI.
23. **Archiv für experimentelle Pathologie u. Pharmacologie.** XIII. 1881. Pag. 70–85, 86–112 und 317–253.
24. **W. S. Hall:** Über Resorption des Carniferrin. Separatabzug aus Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiologische Abtheilung. Pag. 455 bis 490; 1894.

Thesen.

- I. Die giftigen Wirkungen der verschiedenen Schwermetalle auf den thierischen Organismus kommen hauptsächlich dadurch zu Stande, dass der Blutfarbstoff mit dem betreffenden Metall eine Verbindung eingeht und dadurch zur Uebertragung des Sauerstoffs an die Zellen untauglich wird.
- II. Der Unfug, welchen die Drogenhändler mit gesetzwidrigem Ablass verschiedener unerlaubter Medicamente an das Publicum treiben, wird sich nicht eher vermindern, bis die Revisionen der Drogenhandlungen und ähnlichen Einrichtungen, anstatt von Medicinern, von wissenschaftlich ausgebildeten Pharmaceuten ausgeführt werden. — Ebenso müssten auch die Apotheken von Pharmaceuten revidirt werden.
- III. Um das Volk, besonders die Bevölkerung der Städte vor verschiedenen Ansteckungskrankheiten zu schützen und gegen dieselben widerstandsfähiger zu machen, müsste eine jede Stadt zur Controlle

des Victualienhandels vereidigte Nahrungsmittelchemiker anstellen, die dem Publicum leicht zugänglich wären.

- IV. Da eine ganze Anzahl der gefährlichsten ansteckenden Hautkrankheiten durch die Haarschneidestuben verbreitet werden, so müssten dieselben der strengsten hygieinischen Controlle unterworfen und so eingerichtet werden, dass die dort zu benutzenden Geräthschaften leicht, ohne grosse Umkosten, zu jeder Zeit desinficirt werden könnten. Zu diesem Zwecke könnte den Haarschneidestubenbesitzern vorgeschrieben werden, dass sie nur aus vernickeltem Metall angefertigte Bürsten und Kämme benutzen dürfen, welche nach jedesmaliger Benutzung leicht durch 5% Karbolsäure desinficirt werden können.
- V. Die Behauptung, dass die Güte einer Butter durch die Erstarrungstemperatur bestimmt werden kann, ist unrichtig.
- VI. Die zeitweilige Ablagerung der bei Metallvergiftungen entstehenden Verbindungen des Blutfarbstoffes mit dem betreffenden Metall findet hauptsächlich in der Leber, Milz und Niere, so wie in den feinsten Endzweigen der peripheren Capillaren des Unterhautzellgewebes statt.
- VII. In jeder Schule müssten die Anfangsgründe der Hygiene obligatorisch gemacht werden.

- VIII. Die chemischen Untersuchungen der Metallverbindungen des Haemoglobins sind zur Bestimmung der Molekulargrösse des letzteren von grösstem Werth.
- IX. Das Dunkelwerden des Blutes bei der Eisenvergiftung beruht nicht auf Aenderungen des Kohlensäure — resp. des Sauerstoffgehaltes, sondern darauf, dass das dabei entstehende Eisen-Oxyhaemoglobin dunkler aussieht, als das Oxyhaemoglobin.
- X. Die Abnahme der Kohlensäuremenge im Blute bei Metallvergiftungen rührt nicht davon her, dass ein Theil der Blutalkalien durch irgend eine Säure neutralisirt worden wäre, sondern es wird bei solchen Vergiftungen in Folge von mangelhaften Verbrennungsvorgängen im Organismus überhaupt viel weniger Kohlensäure gebildet und an das Blut abgegeben, als unter normalen Verhältnissen.

Inhalt.

I.	Einleitung	7
II.	Voruntersuchungen :	
	1. Stromatafällungen	9
	2. Serumfällungen	11
	3. Serumtitrationen	14
	4. Blutfarbstofffällungen	15
	5. Haemoglobintitrationen	19
III.	Darstellung, Eigenschaften und Zusammensetzung des chemisch- reinen Pferdeblut-Oxyhaemoglobins	25
IV.	Darstellung, Eigenschaften und Zusammensetzung der chemisch- reinen Metall-Oxyhaemoglobin-Verbindungen.	33
V.	Schlussfolgerungen	51
	Litteraturverzeichniss	57
	Thesen.	59
